



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Influência da tecnologia de purificação e estabilização na atividade biológica do microRNA

Ana Rita Trindade Quelhas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Fani Pereira de Sousa
Co-orientadora: Prof^a. Doutora Ângela Sousa

Covilhã, outubro de 2015

*Para as pessoas mais importantes da minha vida,
Os Meus Pais...
Pelo vosso amor, carinho e apoio incondicional.
Amo-vos.*

Agradecimentos

Primeiro de tudo, gostaria de deixar o meu profundo agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Fani Sousa e co-orientadora Professora Doutora Ângela Sousa por toda a dedicação, orientação, paciência e cordialidade com que sempre me trataram ao longo deste meu percurso, e acima tudo por todo o conhecimento científico que me transmitiram.

Não poderei também deixar de agradecer à Patrícia Pereira, pela sua disponibilidade e por todos os conhecimentos imprescindíveis que me transmitiu, o meu sincero obrigado.

Uma palavra de apreço à Universidade da Beira Interior e ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde, onde toda a investigação foi desenvolvida, em especial ao grupo de Biotecnologia e Ciências Biomoleculares.

A todos os meus amigos, uma palavra de gratidão por todo o vosso apoio, dedicação, paciência, alento e confiança transmitida ao longo deste ano.

Quero agradecer à minha família, em especial aos meus avós, Armando e Aninha que mesmo já não estando comigo no finalizar desta minha etapa, sei que onde quer que estejam estão orgulhosos de mim. Obrigado por todos os ensinamentos e por tudo o que sempre fizeram por mim.

Agradeço especialmente aos meus pais, Carlos e Regina por todo o apoio e incentivo nos momentos mais difíceis, por toda a paciência, toda a dedicação, por todo o sacrifício que fizeram e por todo o vosso amor. Obrigado do fundo do coração por acreditarem em mim e por tornarem este sonho possível. Agradeço de igual forma aos meus irmãos pelo vosso carinho e compreensão.

Por último, agradeço ao Francisco Marques pela forma como me deu alento e confiança ao longo destes últimos meses, por toda a sua dedicação, paciência e disponibilidade sempre que precisei, e acima de tudo por me ter ensinado e transmitido que “a exigência é um hábito, quanto mais hábito for a exigência”. Obrigado por todo o teu amor.

A TODOS DEIXO O MEU SENTIDO RECONHECIMENTO!

Resumo

Até há pouco tempo, a molécula de RNA era ainda negligenciada em comparação com o DNA e proteínas, sendo descrito como um simples intermediário no fluxo da informação genética. No entanto, ao longo dos últimos anos o RNA tem sido associado a uma multiplicidade de processos biológicos, sendo hoje em dia, intitulado como um componente celular surpreendente. A investigação em torno da molécula de RNA tem levado a inúmeras descobertas biologicamente importantes e ao desenvolvimento ou aperfeiçoamento de novas abordagens terapêuticas. Um tipo de RNA que tem sido amplamente estudado, devido à potencial aplicação terapêutica, é o microRNA (miRNA). Este RNA pertence à classe dos RNAs de baixo peso molecular que regulam a expressão génica, e a sua desregulação tem sido associada a diversas patologias.

Ainda assim, a necessidade de obter o RNA puro e intacto é extremamente relevante considerando esta vertente de aplicação clínica, e quer o seu isolamento quer a etapa de purificação e armazenamento apresentam-se como passos críticos devido à possível degradação do RNA, o que pode prejudicar a sua estabilidade estrutural e conseqüentemente a sua atividade biológica. Desta forma, torna-se fundamental garantir a estabilidade da molécula após todas as etapas do processo, visando a sua aplicação.

Deste modo, o objetivo global deste estudo consiste no desenvolvimento e implementação de uma nova metodologia que permita manter a conformação nativa e atividade biológica do RNA, após todas as etapas críticas do seu processamento. Inicialmente foram realizados estudos cromatográficos baseados em cromatografia de afinidade com ligandos de aminoácidos, nomeadamente a matriz de L-metionina-agarose, para obter o pre-miR-29 com elevado grau de pureza. Como estes resultados não foram conclusivos, e não foi possível a separação eficiente do pre-miR-29, os estudos de estabilização foram realizados com RNA total.

Assim, foram realizados ensaios de dicroísmo circular (DC) para avaliar a estabilidade estrutural do RNA, após o seu isolamento e incubação com diferentes classes de excipientes, nomeadamente sais (EDTA, citrato de sódio e acetato de sódio) e aminoácidos (histidina, prolina e arginina) nas concentrações de 1, 25 e 100 mM, e açúcares (sorbitol, trealose e sacarose) a 295 e 595 mM. O estudo de estabilidade inclui ainda a avaliação da estabilidade em função do tempo (7, 15 e 30 dias) e temperatura de armazenamento (4, -20 e -80°C). De uma maneira geral, estes testes preliminares indicaram que o RNA na presença de EDTA ou arginina na concentração de 1 mM, conservados a 4°C e -80°C, mantém a sua estabilidade conformacional.

Considerando os resultados obtidos, e para confirmar a ação estabilizadora dos aditivos na manutenção da atividade biológica do RNA foi usado como modelo o pre-miR-29. Estudos recentes apontam para uma alteração dos níveis deste miRNA na doença de Alzheimer (DA). Em condições fisiológicas, o pre-miR-29 pode atuar diretamente sobre a enzima β -secretase 1 (BACE 1) responsável pela clivagem da proteína precursora amilóide (APP) e desta forma

diminuir os depósitos extracelulares dos péptidos β -amilóides (AB). Estes estudos revelam a possibilidade da aplicação do pre-miR-29b como um alvo terapêutico, já que a reposição dos seus níveis nas células neuronais poderá induzir o silenciamento da BACE 1 e redução dos níveis dos péptidos AB.

Assim, no âmbito deste trabalho, o pre-miR-29 recombinante foi preparado e armazenado nas condições que apresentaram melhores resultados de estabilização, no dicroísmo circular, para posteriormente ser avaliada a sua atividade biológica, nomeadamente no que se refere à capacidade de reduzir os níveis de expressão da BACE 1. Após a produção do pre-miR-29, este foi purificado com a matriz de L-arginina-Sepharose, e foram realizados estudos de transfeção das células N2a695. Os resultados obtidos demonstraram que o pre-miR-29 incubado com arginina a -80°C durante 30 dias apresenta uma diminuição da expressão do mRNA da proteína hBACE 1 de cerca de 90-100%, quando comparado com as outras condições de armazenamento testadas.

Palavras-chave

Cromatografia de Afinidade, Dicroísmo Circular, Estabilidade do RNA, pre-miR-29b-1, RNA

Abstract

Until recently, RNA molecule was still neglected comparing to DNA and proteins, being described as a mere intermediate in the flow of genetic information. However, over the past few years, RNA has been associated to a multiplicity of biological processes, being nowadays, entitled as a surprising cellular component. Researches around the RNA molecule have led to numerous biologically important discoveries and to the development or improvement of new therapeutic approaches. A type of RNA that has been widely studied due to its potential therapeutic application is microRNA (miRNA). This RNA belongs to the class of small RNAs that regulates gene expression, and its dysregulation has been linked to various diseases.

Still, the need to obtain pure and intact RNA is extremely important considering its clinical application. The isolation, purification and storage steps are presented as critical steps due to the possible RNA degradation, which can harm its structural stability and consequently its biological activity. Thus, it is essential to ensure the stability of the molecule after all stages of the process, with the view of its application.

Thus, the overall aim of this study is the development and implementation of a new methodology to maintain the native conformation and biological activity of RNA, after all critical stages of processing. Initially, chromatographic studies were performed based on affinity chromatography with amino acid ligands, in particular L-methionine-agarose matrix, in order to obtain the pre-miR-29 with high purity. As these results were inconclusive, and the efficient separation of pre-miR-29 was not possible, stabilization studies were performed with total RNA.

Accordingly, circular dichroism (CD) experiments were performed in order to evaluate the RNA structural stability, after its isolation and incubation with different classes of excipients, including salts (EDTA, sodium citrate and sodium acetate) and amino acids (histidine, proline and arginine) at concentrations of 1, 25 and 100 mM, and sugars (sorbitol, trehalose and sucrose) at 295 and 595 mM. The stability study also included the evaluation of different storage time (7, 15 and 30 days) and storage temperatures (4, -20 and -80°C). In general, these preliminary tests indicated that the RNA in presence of EDTA or arginine at a concentration of 1 mM, stored at 4°C and -80°C, maintains its conformational stability.

Considering the obtained results, and to confirm the stabilizing action of additives on maintenance of the RNA biological activity, pre-miR-29 was used as a model. Recent studies point to a change in the levels of this miRNA in Alzheimer's disease (AD). Under physiological conditions, miR-29 may act directly on β -secretase enzyme (BACE 1) responsible for the cleavage of amyloid precursor protein (APP) and thereby decreasing the extracellular deposits of β -amyloid peptide (A β). These studies indicate the possibility of pre-miR-29b application as a therapeutic target, since the reinstatement of its levels in neuronal cells might induce the silencing of BACE 1, reducing levels of A β peptide.

Thus, in this work, the recombinant pre-miR-29 was prepared and stored using the conditions that have presented better stability results by circular dichroism, to later be evaluated its

biological activity, in particular regarding to the ability of reducing the expression levels of BACE 1. After production of pre-miR-29, it was purified with the L-arginine-Sepharose matrix, and transfection studies were performed in N2a695 cells. The obtained results showed that pre-miR-29 incubated with arginine at -80°C for 30 days induces a decreased of about 90-100% of hBACE 1 mRNA expression, when compared to other tested storage conditions.

Keywords

Affinity Chromatography, Circular Dichroism, pre-miR-29b-1, RNA, RNA stability

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1. Molécula de RNA	1
1.1 Bioquímica da molécula de RNA.....	2
1.1.1 Estrutura do RNA	4
1.2 Biossíntese das moléculas de RNA	6
2. Diferentes tipos de RNA	7
2.1 Pequenos RNAs não-codificantes.....	7
2.2 Longos RNAs não-codificantes (lncRNAs)	9
3. Estratégias de isolamento e purificação do RNA	10
3.1 Purificação da molécula de RNA	13
3.1.1 Cromatografia de exclusão molecular	13
3.1.2 Cromatografia de troca iônica	13
3.1.3 Cromatografia de interação hidrofóbica	14
3.1.4 Cromatografia de afinidade	14
3.1.4.1 Cromatografia de afinidade com aminoácidos imobilizados	16
3.2 Purificação com Monolitos	17
4. Importância da estabilidade da molécula de RNA	18
4.1 Iões metálicos e estabilidade dos ácidos nucleicos	18
4.2 Estabilidade da molécula de RNA por adição de diferentes classes de aditivos	19
4.2.1 Sais.....	20
4.2.2 Aminoácidos.....	21
4.2.3 Açúcares	22
4.3 Técnicas convencionais para a avaliação da estrutura do RNA	23
4.3.1 Dicroísmo Circular (DC)	24
4.4 Estabilização do pre-miR-29 após isolamento e purificação para posterior aplicação terapêutica	25
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	29
1. Materiais.....	29
2. Métodos.....	30
2.1 Condições de crescimento de <i>R. sulfidophilum</i> DSM 1374.....	30
2.2 Condições de crescimento de <i>E. coli</i> DH5a.....	30
2.3 Lise e Isolamento de pequenos RNAs e RNA total	31
2.4 Eletroforese em gel de agarose	31

2.5 Cromatografia de Afinidade.....	32
2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida	33
2.7 Dicroísmo Circular (DC)	33
2.8 Cultura de células	34
2.9 Extração de RNA total a partir das células N2a695	34
2.10 Avaliação dos níveis de expressão do mRNA da hBACE 1 por RT-qPCR	35
Capítulo 3 - Resultados e Discussão.....	37
1. Lise celular da bactéria <i>R. sulfidophilum</i> DSM 1374 e <i>E. coli</i> DH5a	37
2. Ensaio Cromatográfico.....	39
2.1 Purificação do pre-miR-29b-1 usando a matriz de L-metionina-agarose.....	39
3. Dicroísmo Circular	41
3.1 Ensaio de estabilidade da molécula de RNA	41
3.1.1 Sais	42
3.1.2 Aminoácidos.....	47
3.1.3 Açúcares	53
4. Estudos de transfeção do pre-miR-29b-1	61
Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas Futuras	65
Capítulo 5 - Referências bibliográficas.....	69

Lista de Figuras

Figura 1 - Imagem representativa da transmissão da informação genética.	1
Figura 2 - Representação da estrutura das principais bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos.	2
Figura 3 - Diferenças estruturais entre a ribose e a desoxirribose.	3
Figura 4 - Representação da estrutura covalente do polímero de RNA.	3
Figura 5 - Estrutura do RNA.	5
Figura 6 - Etapas gerais do processo de transcrição. Representação do processo que ocorre em procariontes.	6
Figura 7 - Imagem representativa do processo biotecnológico para a preparação de RNA em larga escala.	10
Figura 8 - Imagem representativa da interação das moléculas de RNA com a matriz de agarose-arginina.	16
Figura 9 - Imagem representativa das regiões de fortes ligações em torno da dsRNA e ssRNA.	19
Figura 10 - Espectro padrão de RNA em H ₂ O-DEPC.	24
Figura 11 - Fatores que afetam o processamento e clivagem da APP.	26
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose, de quatro amostras de RNAs de baixo peso molecular obtidas após extração da bactéria <i>R. sulfidophilum</i> e duas amostras de RNAs de baixo peso molecular obtidas após extração da bactéria <i>E. coli</i> DH5a.	38
Figura 13 - Estrutura da L-metionina-agarose imobilizada no suporte e estrutura do pre-miR-29b-1.	39
Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido com a coluna de L-metionina-agarose, para purificação do pre-miR-29b-1 e análise eletroforética em gel de poliácridamida dos respectivos picos recolhidos segundo o cromatograma obtido.	40
Figura 15 - Espectro padrão do RNA obtido após a etapa de extração, sem inclusão de aditivos. RNA em solução de Tris-HCl em água DEPC (pH 8,0).	42
Figura 16 - Espectros de DC da estrutura do RNA em solução sob diferentes concentrações de sal (1 mM, 25 mM e 100 mM, no dia 0).	43
Figura 17 - Elipticidade a 215 nm obtida a partir dos espectros de RNA em solução com 1 mM dos diferentes sais, após armazenamento a 4°C, -20°C e a -80°C, durante 7, 15 e 30 dias. ...	44
Figura 18 - Sobreposição dos espectros de DC resultantes da análise do RNA em solução de 1 mM de EDTA, após armazenamento durante 30 dias, sob várias condições de temperatura (4, -20 e -80°C) e análise eletroforética em gel de poliácridamida das amostras de EDTA + RNA em diferentes temperaturas ao fim de 30 dias.	45
Figura 19 - Elipticidade a 215 nm obtida a partir dos espectros de RNA em solução com 25 mM dos diferentes sais, após armazenamento a 4°C, -20°C e a -80°C, durante 7, 15 e 30 dias. ...	46
Figura 20 - Análise do espectro de DC da estrutura do RNA em solução de 25 mM de acetato de sódio, após 30 dias de armazenamento, à temperatura de 4°C, em sobreposição ao	

espectro padrão e análise eletroforética em gel de poliacrilamida das amostras de Acetato de sódio + RNA à temperatura de 4°C ao fim de 30 dias.	47
Figura 21 - Espectros de DC do RNA em solução com diferentes aminoácidos, em diferentes concentrações, no dia 0.	48
Figura 22 - Espectro de DC obtido na análise do tampão de arginina 100 mM, sem RNA.	49
Figura 23 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 265 nm, na presença de 1 mM dos diferentes aminoácidos, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: 7 dias, 15 dias e 30 dias.	50
Figura 24 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 265 nm, na presença de 25 mM dos diferentes aminoácidos, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: 7 dias, 15 dias e 30 dias.	51
Figura 25 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 265 nm, na presença de 100 mM dos diferentes aminoácidos, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: 7 dias, 15 dias e 30 dias.	52
Figura 26 - Espectros de DC do RNA em solução com diferentes açúcares, em diferentes concentrações, no dia 0.	54
Figura 27 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 265 nm, na presença de 295 mM dos diferentes açúcares, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: 7 dias, 15 dias e 30 dias.	56
Figura 28 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 265 nm, na presença de 590 mM dos diferentes açúcares, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: 7 dias, 15 dias e 30 dias.	57
Figura 29 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 215 nm, na presença de 295 mM dos diferentes açúcares, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: 7 dias, 15 dias e 30 dias.	58
Figura 30 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 215 nm, na presença de 590 mM dos diferentes açúcares, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: 7 dias, 15 dias e 30 dias.	59
Figura 31 - Níveis de expressão do mRNA da hBACE1 após transfeção com pre-miR-29 sujeito às melhores condições reveladas nos estudos de DC.	61

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Pequenos RNAs não-codificantes, respetivas características e envolvimento em mecanismos celulares.	8
Tabela 2 - Tipos de lncRNAs, respetivas características e envolvimento em mecanismos celulares.	9
Tabela 3 - Técnicas de isolamento utilizadas na preparação de RNA.	12
Tabela 4 - Métodos de cromatografia de afinidade para a purificação de RNA.	15
Tabela 5 - Caracterização das interações entre aminoácidos básicos e ácidos nucleicos na cromatografia de afinidade.	17
Tabela 6 - Aditivos comumente utilizados para a estabilização de macromoléculas.	20
Tabela 7 - Principais vantagens e limitações da utilização de sais como excipientes.	21
Tabela 8 - Principais vantagens e limitações da utilização dos aminoácidos como excipientes.	22
Tabela 9 - Principais vantagens e limitações da utilização dos açúcares como excipientes. ...	23
Tabela 10 - Valor de elipticidade a 265 nm no dia 0 para os diferentes aminoácidos, na concentração de 1 mM com RNA.	50
Tabela 11 - Valor de elipticidade a 265 nm no dia 0 para os diferentes aminoácidos, na concentração de 25 mM com RNA.	51
Tabela 12 - Valor de elipticidade a 265 nm no dia 0 para os diferentes aminoácidos, na concentração de 100 mM com RNA.	52
Tabela 13 - Valor de elipticidade a 265 nm no dia 0 para os diferentes açúcares, na concentração de 295 mM com RNA.	55
Tabela 14 - Valor de elipticidade a 265 nm no dia 0 para os diferentes açúcares, na concentração de 590 mM com RNA.	57
Tabela 15 - Valor de elipticidade a 215 nm no dia 0 para os diferentes açúcares, na concentração de 295 mM com RNA.	58
Tabela 16 - Valor de elipticidade a 215 nm no dia 0 para os diferentes açúcares, na concentração de 590 mM com RNA.	59

Lista de Acrónimos

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amónio
μg	Micrograma
μL	Microlitro
A	Adenina
AGO	Argonauta
APP	“ <i>Amyloid precursor protein</i> ”
Arg	Arginina
AB	Péptido β -amilóide
BACE 1	β -secretase 1
C	Citosina
cDNA	Cadeia complementar de DNA
cGMP	“Atuais boas práticas de fabrico”
crasiRNAs	“ <i>Centromere repeat associated small interacting RNAs</i> ”
DA	Doença de Alzheimer
DC	Dicroísmo Circular
DEPC	Dietilopirocarbonato
DMEM	“ <i>Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium</i> ”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO_{600}	Densidade ótica a 600 nm
dsRNA	RNA de dupla cadeia
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EMA	“Agência Europeia de Medicina”
FBS	Soro Fetal de Bovino
FDA	“ <i>Food and Drug Administration</i> ”
FTIR	Transformada de Fourier
g	Constante gravitacional
G	Guanina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
gDNA	DNA genómico
hBACE 1	Proteína humana β -secretase 1
L	Litros
LincRNAs	Longos RNAs não-codificantes intergénicos
lncRNA(s)	Longos RNA(s) não-codificantes
M	Molar
mA	Miliamper

min	Minutos
miR-29	MicroRNA-29
miRNA(s)	MicroRNA(s)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MWCO	<i>“Molecular weight cut off”</i>
ncRNA	RNA não-codificante
nm	Nanômetros
oc	Circular aberta
OMS	<i>“Organização Mundial de Saúde”</i>
PASRs	<i>“Promoter-associated small RNAs”</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDNA	DNA plasmídico
piRNAs	PIWI-RNAs
<i>R. sulfidophilum</i>	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>
RISC	<i>“RNA-Induced Silencing Complex”</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNAP	RNA polimerase
RNase(s)	Ribonuclease(s)
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
sc	Superenrolada
siRNAs	Pequenos RNAs de interferência
snoRNAs	Pequenos RNAs nucleolares
SPE	Extração de fase-sólida
sRNA(s)	RNA(s) de baixo peso molecular
ssRNA	Cadeia simples de RNA
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TB	Terrific Broth
TBE	Tris-Borato-EDTA
tel-sRNAs	<i>“Telomere-specific small RNAs”</i>
TERRAs	ncRNAs associados a telômeros
tiRNAs	<i>“Transcription initiation RNAs”</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	RNA de transferência

T-UCRs	Regiões de transcritos ultraconservados
U	Uracilo
UV	Ultravioleta
V	Volte

Capítulo 1

Introdução

A função normal das células dos organismos vivos está diretamente dependente da expressão de um grande número de ácidos ribonucleicos (RNAs) codificantes - RNA mensageiro (mRNA) - que são responsáveis por codificar inúmeras proteínas. No entanto, outros RNAs designados por não-codificantes são igualmente importantes em diversos processos celulares, estando envolvidos nomeadamente no processo de transcrição, no processamento de RNAs, como por exemplo pequenos RNAs (sRNAs) e na tradução nomeadamente pelos RNAs ribossomais (rRNAs) e RNAs de transferência (tRNAs) [1]. Estudos recentes, têm demonstrado que a molécula de RNA está também associada a diversas vias regulatórias, podendo mesmo conduzir ao desenvolvimento de diversas doenças oncológicas e neurodegenerativas, devido a alterações nos seus níveis de expressão. Daí ser importante o seu estudo, quer ao nível estrutural, quer ao nível funcional, uma vez que se prevê a sua aplicabilidade no desenvolvimento de novas terapias e avaliação como alvo terapêutico [1].

1. Molécula de RNA

A descoberta da molécula de RNA, surgiu em meados de 1869 pelo biólogo suíço Friedrich Miescher, e desde essa altura, a definição da sua função biológica evoluiu de um simples intermediário entre proteínas e o DNA (ácido desoxirribonucleico), para a definição de uma molécula dinâmica e versátil, com a capacidade de regular a expressão de diversos genes nas células [2,3]. Watson e Crick, descreveram em 1953 que a molécula de DNA de dupla hélice, era de extrema relevância pois tanto poderia conter informação genética como replicá-la, encontrando-se o RNA durante muitos anos revestido de incertezas no que diz respeito, à sua verdadeira função [4].

A molécula de RNA tem origem no processo de transcrição (figura 1) e a sua principal função está associada à capacidade de transferir a informação genética para a síntese de proteínas nos ribossomas, no entanto o RNA pode ainda assumir o papel da molécula de DNA como portador da informação genética e ainda funcionar como uma enzima (Ribozima) [5].

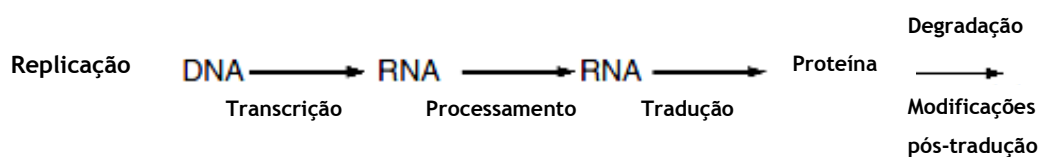


Figura 1 - Imagem representativa da transmissão da informação genética (adaptado de [6]).

A centralidade do RNA recaiu nas suas propriedades bioquímicas, e a sua função está também inteiramente relacionada com a sua capacidade de formar estruturas secundárias, permitindo assim “proteger” algumas regiões da molécula, fazendo, no entanto a exposição de outras para o seu reconhecimento, facilitando desta forma interações com outras moléculas. O RNA pode ainda assumir estruturas terciárias, adquirindo uma superfície capaz de interagir com ambientes internos criando sítios de ligação para iões metálicos e assim promover reações catalíticas [7].

Ao longo dos últimos 20 anos, o RNA provou ser então uma molécula química versátil apesar da sua aparente simplicidade [8].

1.1 Bioquímica da molécula de RNA

O RNA é um polímero formado por unidades repetitivas de ribonucleótidos, sendo estes estruturalmente constituídos por uma ribose (açúcar em forma de anel heterocíclico com cinco carbonos), um grupo fosfato (molécula de fósforo com quatro oxigénios) e uma base azotada (anel heterocíclico com átomos de azoto e carbono). As bases azotadas dividem-se em dois tipos fundamentais (figura 2): as pirimidinas que são constituídas por um anel de seis átomos, integrando a citosina (C), a timina (T) e o uracilo (U), e as purinas constituídas por dois anéis que se combinam entre si, um com seis e outro com cinco átomos, incluindo a adenina (A) e a guanina (G) [9].

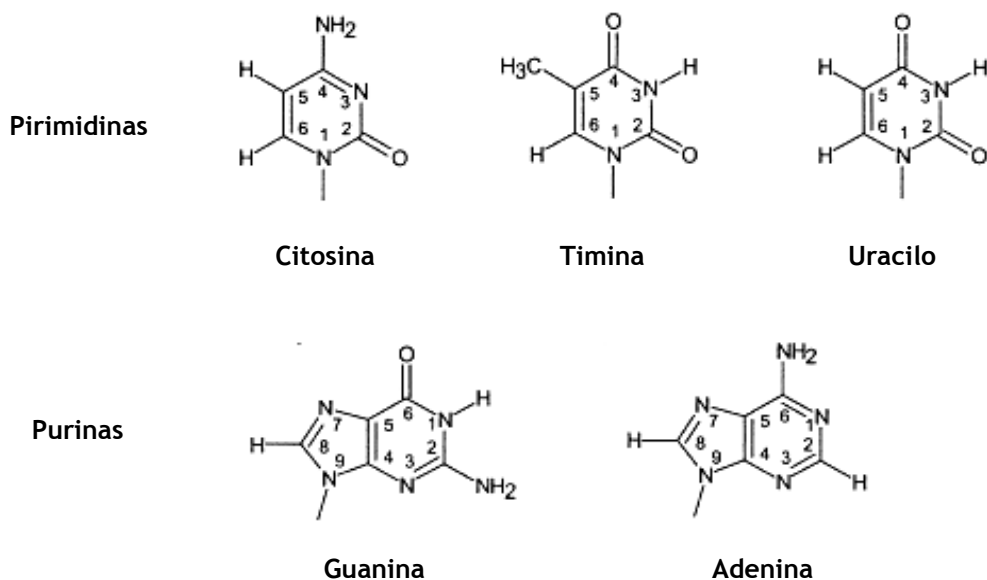


Figura 2 - Representação da estrutura das principais bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos (adaptado de [5]).

A nível químico e estrutural a molécula de RNA é muito semelhante à estrutura nativa do DNA (figura 3), diferindo apenas em três aspetos básicos: primeiro o RNA usa como base azotada o uracilo (U) em substituição da timina (T); os ribonucleótidos possuem dois grupos hidroxilos (OH) na posição 2' e 3' da ribose enquanto o DNA contém apenas um grupo hidroxilo (OH) na posição 3' da desoxirribose; e o RNA é frequentemente de cadeia simples e bastante flexível enquanto o DNA se organiza estruturalmente em dupla hélice [9].

As diferenças estruturais são importantes na estabilidade das moléculas. De facto, o açúcar da desoxirribose é menos reativo devido às ligações C-H presentes na posição 2', o que torna o DNA mais resistente à hidrólise alcalina, ao contrário do RNA que é mais sensível à clivagem nucleófila, sendo facilmente hidrolisado por iões hidróxido [10].

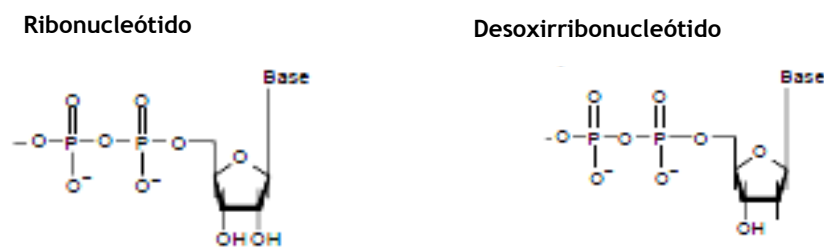


Figura 3 - Diferenças estruturais entre a ribose e a desoxirribose (adaptado de [9]).

É a partir das ligações fosfodiéster sucessivas entre os nucleótidos que o polímero de RNA se vai estruturando [9]. Os nucleótidos ligam-se entre si por ligações covalentes através dos fosfatos presentes no ribonucleótido, mais precisamente no grupo hidroxilo-5' de um dos nucleótidos que se une ao grupo hidroxilo-3' do nucleótido seguinte. Desta forma, o “esqueleto” do RNA consiste em resíduos de fosfato e ribose alternantes e as bases azotadas encontram-se nos grupos laterais (figura 4) [11,12].

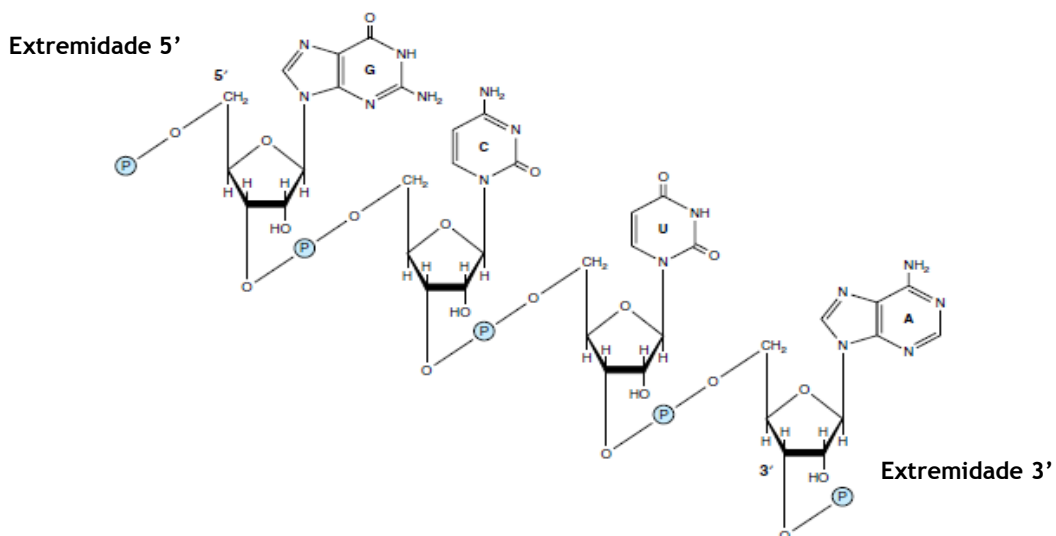


Figura 4 - Representação da estrutura covalente do polímero de RNA (adaptado de [13]).

1.1.1 Estrutura do RNA

A molécula de RNA é descrita como sendo uma sequência linear de monómeros designados por nucleótidos, que se podem dobrar em torno de si mesmos, originando desta forma estruturas tridimensionais (figura 5c) [14]. A sua propensão para formar estruturas secundárias facilita a interação com outras moléculas de RNA, o que permite expor algumas das suas sequências para um reconhecimento mais facilitado [10].

Para além das estruturas secundárias, o RNA pode ainda adotar estruturas mais complexas, como é o caso da estrutura terciária, e são estas formas mais complexas que concedem ao RNA a capacidade de “partilhar” a sua informação e promover reações catalíticas [14,15].

A ordenação linear de nucleótidos é designada por estrutura primária, ou sequência primária de RNA (figura 5a). Esta estrutura é mantida por fortes ligações covalentes, não sendo tão estáveis como na molécula de DNA. Por outro lado, as ligações de hidrogénio são relativamente fracas e podem ser formadas entre dois ou três nucleótidos, que estejam relativamente próximos entre si, permitindo assim que o RNA se consiga dobrar e deste modo formar estruturas mais complexas, nomeadamente as estruturas secundárias e terciárias [14].

Por outro lado, a estrutura secundária da molécula de RNA é definida pelo “emparelhamento” intramolecular de bases, ou seja pelo rearranjo dos nucleótidos, que desta forma minimizam a energia livre da molécula [15]. Esta estrutura tem por base a estrutura primária do RNA, e as sucessivas ligações de hidrogénio e de *van der Waals*, mantendo assim o RNA biologicamente ativo [16].

A estrutura secundária do RNA mais comum é a conformação em “hairpin”, que consiste numa cadeia dupla de RNA (dsRNA), que contém sequências não emparelhadas e induz a formação de um loop (figura 5b). Esta estrutura da molécula em forma de “hairpin”, pode determinar as interações com a ribozima, proteger o mRNA da sua degradação, servir como local de reconhecimento para as proteínas se ligarem ao RNA ou atuar como um substrato para promover reações enzimáticas [17].

Todavia, a estrutura terciária do polímero de RNA é também fundamental para a compreensão da sua atividade biológica [18]. A estrutura tridimensional forma-se a partir de hélices duplas de RNA com bases complementares em cadeia, sendo esta estrutura comparada com a estrutura complexa das proteínas (figura 5c) [19]. Esta conformação pode ter origem devido à enorme liberdade de rotação que o RNA possui na região de bases não-emparelhadas, promovendo interações entre estruturas distantes [15]. Atualmente, existem diversas técnicas que permitem determinar as estruturas terciárias do RNA, sendo as mais usuais, a cristalografia de Raios-X, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Microscopia eletrónica [15,18]. De uma maneira geral, a conformação tridimensional do RNA pode assumir a forma de “Stem-loop”, “Tetraloop”, “Loops” internos e “Pseudoknots” [15].

1.2 Biossíntese das moléculas de RNA

A síntese das diversas espécies de RNAs, embora obedecendo a mecanismos universais de transcrição de cadeias codificantes do DNA genómico (gDNA), apresenta no entanto diferenças relacionadas com o tipo de células em que ocorrem, assim como com o tipo de RNA que é sintetizado [20].

A biossíntese do RNA é iniciada por RNA polimerases (RNAPs - holoenzima), essenciais para o início do processo de transcrição. Este processo pode ser dividido em 5 fases, incluindo o (i) recrutamento da RNA polimerase que se liga à molécula de DNA e localiza uma sequência promotora, (ii) associação da RNA polimerase ao DNA resultando na abertura da dupla cadeia de DNA, (iii) libertação do promotor, (iv) início da síntese da cadeia de RNA pela adição de nucleótidos e por fim a (v) libertação da molécula de RNA e da RNA polimerase (figura 6) [21].

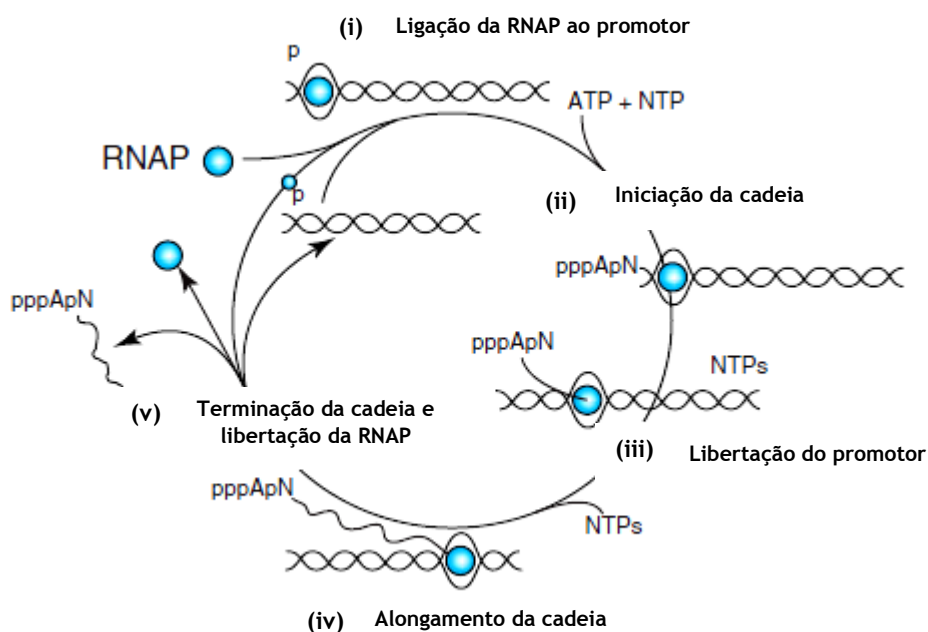


Figura 6 - Etapas gerais do processo de transcrição. Representação do processo que ocorre em procariotas (adaptado de [13]).

2. Diferentes tipos de RNA

Até recentemente, o RNA não era tão estudado como o DNA ou as proteínas, sendo muitas vezes identificado como um simples intermediário no fluxo de informação genética. Presentemente, o RNA é conhecido por desempenhar diversos papéis a nível funcional e ser responsável por uma multiplicidade de processos biológicos essenciais [10]. Contudo, os RNAs que não funcionam como o mRNA, no papel fulcral da síntese proteica, compreendem uma classe diversa de moléculas que são comumente designados como RNAs não-codificantes (ncRNAs) [22].

Atualmente, os ncRNAs dividem-se em duas classes principais: pequenos RNAs não-codificantes e longos RNAs não-codificantes (lncRNAs). Estas biomoléculas são conhecidas há bastante tempo, mas a sua importância não foi valorizada inteiramente até recentes pesquisas do genoma [22].

2.1 Pequenos RNAs não-codificantes

Os pequenos RNAs não-codificantes têm capacidade regulatória em diversas vias celulares, e o seu tamanho varia geralmente entre 20 e 300 nucleótidos [23]. Estes podem ser divididos em pequenos RNAs endógenos de interferência (RNAi), pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs), entres outros. O RNA de interferência tem um mecanismo natural de regulação da expressão de genes, resultante do silenciamento pós-transcricional de RNA, desencadeado principalmente por percursores de RNA de cadeia dupla (dsRNA) que variam no seu tamanho e origem [24].

A biogénese dos pequenos ncRNAs inicia-se com a clivagem do RNA de cadeia dupla em cadeias simples e mais pequenas. Para a síntese de pequenos ncRNAs é fundamental a ação de duas enzimas para o seu processamento: a Drosha que reconhece e cliva as extremidades de pequenas estruturas de RNA em forma de “hairpin” ainda no núcleo da célula e a Dicer que cliva as regiões em Stem-loop, resultando em pequenos ncRNAs “maduros” [25]. Este processo está diretamente interligado com as proteínas da família argonauta (AGO), que promovem o reconhecimento destas pequenas sequências pelo complexo enzimático “*RNA-Induced Silencing Complex*” (RISC), que desta forma vai atuar na regulação da expressão génica, como por exemplo, à degradação do transcrito ou à repressão da tradução [26].

A síntese dos diferentes RNAs da classe dos pequenos ncRNAs distingue-se também pelo processo estar associado ou não à enzima Dicer, daí serem classificados como dependentes da enzima Dicer, tais como o microRNA (miRNA) ou independentes desta enzima como é o caso dos PIWI RNAs (piRNAs) [24].

A tabela 1 apresenta resumidamente os diferentes tipos de pequenos ncRNAs existentes, assim como as suas principais características e funções.

Tabela 1 - Pequenos RNAs não-codificantes, respetivas características e envolvimento em mecanismos celulares (adaptado de [24]).

Classe	Abreviatura	Características	Mecanismos celulares
MicroRNAs	miRNAs	18-25 nucleótidos; Representam 1-2% do genoma humano; Controlam 50% dos genes codificantes; Dependem das enzimas Dicer e Drosha para a sua biogénese.	Regulação da proliferação, diferenciação e apoptose; Regulação do mRNA.
Pequenos RNAs de interferência	siRNAs	19-23 nucleótidos; Formam-se a partir do processamento da Dicer; Conduzem à degradação específica da sequência de mRNA alvo.	Silenciamento pós-transcricional de genes através do mecanismo de degradação RISC; Defesa contra ácidos nucleicos patogénicos.
Piwi RNAs	PiRNAs	26-30 nucleótidos; Ligam-se às proteínas Piwi; Independentes da enzima Dicer; Restringidos principalmente às células germinativas e somáticas que fazem fronteira com o germline.	Envolvidos em células germinativas e silenciamento de retrotransposões.
Pequenos RNAs nucleolares	snoRNAs	60-300 nucleótidos; Enriquecidos no nucléolo; Cortam intrões do pré-miRNA em vertebrados; Ligam proteínas snoRNP.	Função importante na maturação de outros RNAs não codificantes (rRNAs e snRNAs); Regulação do mRNA.
“Promoter-associated small RNAs”	PASRs	20-200 nucleótidos; Coincidem com os locais de início da transcrição de proteínas e genes não codificantes.	Envolvidos na regulação da transcrição de genes codificantes, através de complexos de silenciamento epigenéticos.
“Transcription initiation RNAs”	tiRNAs	-18 nucleótidos; Mostram padrões de conservação posicional; Localizados preferencialmente nos promotores ricos em GC.	Envolvidos na regulação da transcrição de genes codificantes, através de complexos de silenciamento epigenéticos.
“Centromere repeat associated small interacting RNAs”	crasiRNAs	34-42 nucleótidos; Processados a partir de longos dsRNAs.	Envolvidos no recrutamento da heterocromatina e/ou proteínas centroméricas.
“Telomere-specific small RNAs”	tel-sRNAs	-24 nucleótidos; Independentes da enzima Dicer na sua biogénese; Conservados evolutivamente desde os protozoários até aos mamíferos; Não foram descritos em humanos até agora.	A relação entre tel-sRNAs e a doença ainda não foi descoberto; Regulação epigenética.
Pyknons	–	Não têm tamanho definido; Formato em mosaico em regiões não traduzidas e codificantes.	Possível ligação com o silenciamento pós-transcricional de genes; Envolvidos principalmente na comunicação celular, regulação da transcrição, sinalização e transporte.

2.2 Longos RNAs não-codificantes (lncRNAs)

Os lncRNAs são um grupo heterogêneo de transcritos não-codificantes com mais de 200 nucleótidos que se encontram envolvidos em múltiplas funções biológicas, tais como, a regulação epigenética, apoptose, regulação/controlo do ciclo celular, “splicing” e no desenvolvimento e diferenciação celular [27,28]. Muitos dos lncRNAs identificados são principalmente transcritos pela RNA polimerase II (RNAPII), e geralmente contêm sinais de poliadenilação [24]. Uma das suas características é a capacidade em captar outras moléculas, como é o caso do microRNA e proteínas [29].

A tabela 2 apresenta, de uma maneira geral, os diferentes tipos de lncRNAs, abordando as principais funções e características.

Tabela 2 - Tipos de lncRNAs, respetivas características e envolvimento em mecanismos celulares (adaptado de [24]).

Classe	Abreviatura	Características	Mecanismos celulares
Longos RNAs não-codificantes intergênicos	lincRNAs	Podem ir desde centenas a dezenas de milhares de nucleótidos e encontram-se em intervalos genómicos.	Envolvidos na tumorigénese e metástase do cancro e em diversos processos biológicos.
Longos RNAs não-codificantes intrões	–	Podem ser encontrados dentro dos intrões: evolutivamente conservados.	Encontram-se expressos em cancros.
ncRNAs associados a telómeros	TERRAs	100 pb até 9 kb; Conservados entre eucariotas; Sintetizados a partir de cadeias ricas em C; Poliadenilado; Podem formar estruturas G-quadruplex intermolecular com DNA telomérico de cadeia simples.	Possível impacto em doenças associadas a telómeros, incluindo vários tipos de cancros; Regulação negativa do tamanho dos telómeros pela ação da inibição da telomerase.
Longos RNAs não-codificantes com dupla função	–	Têm a capacidade de promover a codificação de proteínas como de desempenhar funções regulatórias.	A sua desregulação tem sido descrita no cancro da mama e do ovário; Têm a função de modular a expressão do gene através de diversos mecanismos.
RNAs pseudogeneses	–	Têm a capacidade de fazer cópias de genes que perderam a capacidade de codificar proteínas.	Frequentemente desregulados durante a tumorigénese e a progressão do cancro: têm como função a regulação do tumor pela ajuda dos microRNAs, agindo como supressores oncogénico.
Regiões de transcritos ultraconservados	T-UCRs	Têm mais que 200 pb; Altamente conservados em humanos e ratos; Localizados em regiões intra e intergênicas.	A sua expressão é alterada em alguns tipos de cancro; Possível envolvimento na tumorigénese e podem ser inibidores anti-sense de genes que codificam proteínas ou outros ncRNAs.

3. Estratégias de isolamento e purificação do RNA

A crescente consciência de que o RNA é uma das moléculas centrais em diversos processos celulares, revela também a sua potencial aplicabilidade a nível terapêutico, daí ser extremamente relevante garantir a sua integridade, pureza e estabilidade [2,30].

Como o RNA emerge numa nova classe de produtos bioterapêuticos, a sua produção deve ser realizada segundo as atuais boas práticas de fabrico (cGMP), sendo essencial que o bioproduto cumpra os requisitos estabelecidos pelas autoridades reguladoras, tais como a “*Food and Drug Administration*” (FDA), a Agência Europeia de Medicina (EMA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) [10].

Portanto é essencial o desenvolvimento e a otimização dos métodos de isolamento e de purificação do RNA por forma a garantir a sua qualidade, explorando processos biotecnológicos eficientes, rápidos e economicamente viáveis. Este processo engloba várias etapas, que podem seguir o esquema da figura 7.

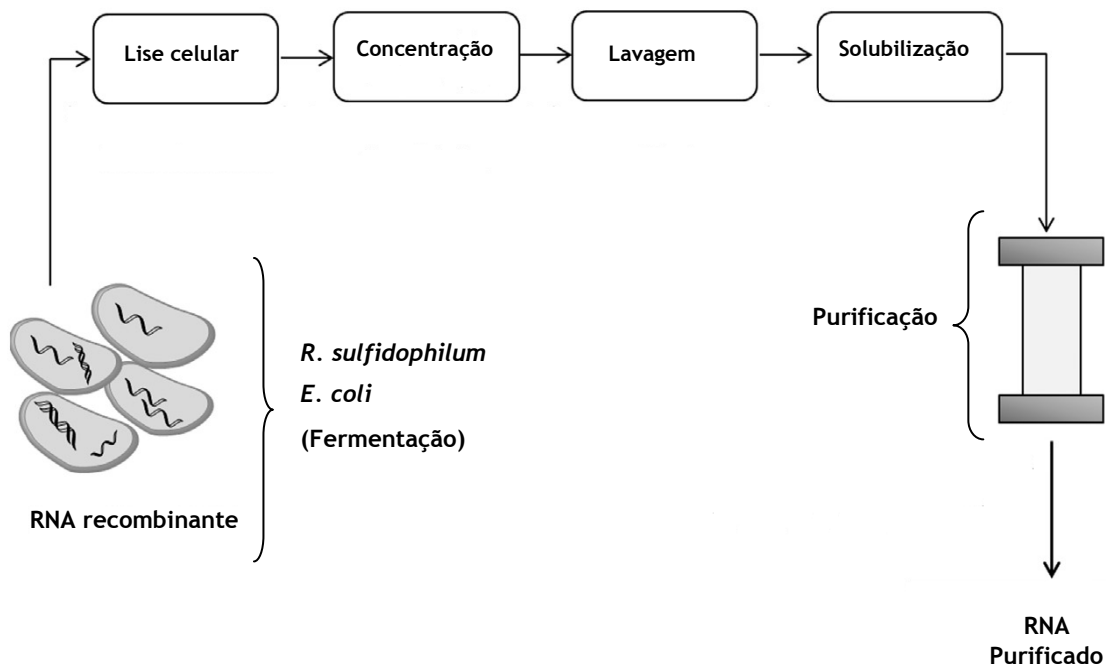


Figura 7 - Imagem representativa do processo biotecnológico para a preparação de RNA em larga escala (adaptado de [10]).

O isolamento do RNA é um processo bastante sensível e crítico. Esta molécula caracteriza-se por ser bastante instável e ter um tempo de vida muito curto, o que se deve à presença ubíqua de enzimas capazes de degradar o RNA (RNases) [31]. Para superar esta problemática, o desenvolvimento de novas ferramentas que permitem o isolamento do RNA biologicamente e quimicamente ativo, é de particular importância [30].

Atualmente, a metodologia mais utilizada para a extração de RNA de diversas fontes (células e tecidos humanos) é o método de extração baseado na combinação de agentes desnaturantes, em particular, o tiocianato de guanidina, fenol e clorofórmio que já se encontra descrito na literatura desde 1987 por Chomczynski e Sacchi [32]. Este método simplificou o isolamento do RNA, uma vez que conjuga todos os passos de extração num único, reduzindo assim o tempo e o tamanho da amostra necessária, aumentando consequentemente o rendimento e minimizando a perda de RNA [2]. Porém, este procedimento tem algumas limitações devido à utilização de produtos tóxicos e de ser exclusivamente dependente do operador [30].

Todavia, existem outros métodos para o isolamento do RNA, tais como, a extração com base numa matriz de sílica em fase sólida (SPE), eletroforese em gel de poliacrilamida e precipitação com Cloreto de lítio (LiCl) [10].

Atualmente, existem diversos kits comerciais (Qiagen (Dusseldorf, Alemanha), Ambion (Austin, TX, EUA) e Promega (Madison, WI, EUA)) que permitem um isolamento seguro, facilitado e com maior rendimento em termos de qualidade e quantidade de RNA [33]. A maioria dos kits existentes usa a tecnologia de extração à base de uma matriz de SPE, ou uma extração com base numa tecnologia de grânulos magnéticos em que os RNAs de baixo peso molecular são separados a partir do RNA total pela sua capacidade em se ligarem aos grânulos magnéticos [25,34].

A tabela 3 resume os princípios, as vantagens e as desvantagens das várias técnicas de isolamento para o RNA.

Tabela 3 - Técnicas de isolamento utilizadas na preparação de RNA (adaptado de [10]).

Método	Princípio	Vantagens	Desvantagens
Tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio	<p>Uso de agentes caotrópicos que ajudam na lise das células e na inativação das RNases.</p> <p>O DNA e as proteínas são removidas na fase orgânica durante a extração com fenol/clorofórmio.</p> <p>O RNA é precipitado pela adição de isopropanol.</p>	<p>Barato, proteção reforçada contra RNases, bons rendimentos e pureza.</p>	<p>Exigência de produtos químicos altamente tóxicos, processo demorado e dependente do operador, inibição da atividade da enzima.</p>
Purificação com sílica	<p>Uso de agentes caotrópicos que ajudam na lise das células e na inativação das RNases.</p> <p>O RNA e o DNA que são polianiónicos ligam-se às partículas de sílica. O DNA é digerido com DNase.</p> <p>Os contaminantes são removidos na etapa de lavagem e o RNA é eluído com baixa força iônica.</p>	<p>Rápido, não requer o uso de solventes orgânicos ou precipitação com álcool, passível de automação.</p>	<p>Baixa capacidade de purificação com base em mecanismos de adsorção/dessorção sobre superfícies sólidas.</p> <p>Não discrimina entre RNA ou DNA, requer tratamento com DNases.</p>
Eletroforese de acrilamida (PAGE)	<p>Separa moléculas com base nas suas cargas hidrodinâmicas e propriedades elétricas.</p> <p>O RNA de interesse é eluído a partir da matriz de gel, concentrada e equilibrada em tampão.</p>	<p>Produto altamente purificado.</p>	<p>Processo demorado, introduz contaminantes, utiliza condições desnaturantes, baixos rendimentos.</p>
Precipitação com Cloreto de Lítio (LiCl)	<p>Separação seletiva de sequências de pequenos RNAs e de longos RNAs de impurezas.</p> <p>Elevada concentração de LiCl é adicionado às preparações impuras de RNA, seguindo-se uma incubação a -20°C durante várias horas ou “overnight”.</p> <p>Os precipitados ou sobrenadantes são recuperados de acordo com o tipo de RNA necessário.</p>	<p>Separação de Pequenos e longos RNAs, recuperação de longos RNAs a partir de impurezas na síntese de transcrição <i>in vitro</i>.</p>	<p>Precipitações ineficientes, Introdução de lítio metálico nas preparações, uso de fenol/clorofórmio para melhorar o isolamento, processo demorado.</p>

3.1 Purificação da molécula de RNA

A etapa de purificação da molécula de RNA é de extrema relevância no decorrer de todo o processo para a obtenção de uma molécula pura, estável, intacta e livre de contaminantes (DNA genómico, proteínas e solventes orgânicos), que podem afetar a sua aplicação a nível terapêutico [31]. A cromatografia é sem dúvida um dos métodos mais diversos e robustos na área da biotecnologia, quer a nível analítico quer preparativo [35].

Para a purificação de moléculas de RNA têm sido exploradas diversas técnicas cromatográficas, tais como, cromatografia de exclusão molecular (tamanho), cromatografia de troca iónica (carga), cromatografia de afinidade baseada em tags e a cromatografia de interação hidrofóbica (hidrofobicidade). No entanto, estes métodos trazem algumas limitações ao passo de purificação devido ao uso de enzimas e modificações estruturais da molécula de RNA, por exemplo pela introdução de sequências tag, que podem afetar a topologia global do RNA [31].

Atualmente, tem sido muito explorada a cromatografia de afinidade com aminoácidos para a purificação dos ácidos nucleicos, sendo uma técnica que tem por base o bioreconhecimento específico entre o ligando e a biomolécula alvo [36,37].

3.1.1 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular tem como princípio básico a separação de diferentes biomoléculas em função do seu tamanho molecular [38]. A aplicação deste princípio cromatográfico, em ácidos nucleicos é facilitada pelo simples facto de as macromoléculas, como é o caso do gDNA e o DNA plasmídico (pDNA), eluírem perto do limite de exclusão da matriz, e as moléculas de baixo peso molecular, como o RNA, mostrarem uma maior retardação [39]. Esta técnica é ideal para as etapas de polimento final na purificação, pois permite remover contaminantes residuais pela troca sucessiva de tampões [11].

3.1.2 Cromatografia de troca iónica

A cromatografia de troca iónica promove a separação baseando-se na interação reversível entre uma biomolécula carregada e uma matriz cromatográfica com carga oposta. No caso da cromatografia de troca aniónica, os ligandos carregados positivamente acoplados à matriz polimérica, tais como aminas quaternárias, promovem fortes ligações com as moléculas alvo carregadas negativamente [40]. Em particular, a purificação do RNA através deste método cromatográfico explora a sua natureza polianiónica, que permite a interação com os ligandos imobilizados e carregados positivamente [39]. A retenção dos ácidos nucleicos é diretamente proporcional à densidade de carga e também devido à sequência e conformação dos ácidos nucleicos [11]. A troca aniónica continua a ser a técnica cromatográfica mais usual para a purificação de ácidos nucleicos, pois oferece a vantagem de uma separação rápida [39].

3.1.3 Cromatografia de interação hidrofóbica

O método cromatográfico de interação hidrofóbica tem por base a separação de diferentes biomoléculas presentes numa amostra, a partir de interações reversíveis que se formam entre ligandos imobilizados com grupos hidrofóbicos e as regiões apolares das biomoléculas de interesse. Neste método cromatográfico, a interação das biomoléculas ocorre com elevadas concentrações de sal [39]. A ligação dos ácidos nucleicos neste processo cromatográfico é afetada principalmente pelo seu tamanho, composição das bases e estrutura das biomoléculas [40]. No entanto, outros parâmetros podem afetar a retenção e a seletividade da biomolécula alvo como é o caso, da temperatura e do pH [41].

A exigência de elevadas concentrações de sal é uma das limitações deste método, nomeadamente quando aplicado a nível industrial, pois o uso de sal em grandes quantidades acarreta custos elevados e provoca um impacto ambiental significativo [40]. A eluição da biomolécula de interesse é conseguida pela diminuição da concentração de sal na fase móvel, ou seja, a diminuição da força iónica leva ao enfraquecimento das interações hidrofóbicas entre a matriz cromatográfica e a biomolécula alvo [42].

3.1.4 Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade é um dos tipos mais versáteis e adaptáveis de cromatografia líquida, uma vez que é a única técnica que utiliza um agente de ligação específico para purificar biomoléculas com base na sua função biológica ou estrutura química [39]. O uso desta metodologia tornou-se útil no desenvolvimento de produtos de interesse terapêutico devido à propriedade única de simular e se basear em processos biológicos, tais como, o reconhecimento molecular entre ácidos nucleicos e proteínas, que aqui se reflete na purificação seletiva da biomolécula alvo [10]. A principal vantagem deste princípio cromatográfico está associada à sua capacidade de estabelecer diferentes tipos de interações, tais como, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, forças de *van der Waals* ou pontes de hidrogénio, que conduzem ao bioreconhecimento específico da biomolécula pelo seu ligando. Assim, a biomolécula de interesse é separada de uma amostra complexa, aumentando o seu grau de pureza e de recuperação [10]. Outras vantagens da cromatografia de afinidade consistem na eliminação de passos adicionais, no aumento do rendimento do processo e no facto de ser economicamente mais rentável. Todavia, também apresenta algumas limitações, nomeadamente no que diz respeito à origem biológica dos ligandos, que tendem a ser frágeis e com baixas capacidades de ligação [40].

Atualmente, têm sido desenvolvidas novas estratégias de afinidade para a purificação da molécula de RNA, nomeadamente a cromatografia de afinidade por “emparelhamento” das bases, afinidade baseada em tags e interação aminoácido-RNA, como a tabela 4 apresenta resumidamente.

Tabela 4 - Métodos de cromatografia de afinidade para a purificação de RNA (adaptado de [10]).

Tipo de afinidade	Princípio	Vantagens	Desvantagens
“Emparelhamento das bases”	Caudas poli (A) presentes em moléculas de mRNA que interagem especificamente com o oligo (dT) imobilizado.	Alto rendimento de mRNA, qualidade cGMP (boas práticas de produção). Pode ser usado sem isolamento intermédio de RNA total.	Não faz o isolamento de nenhum mRNA poliadenilado.
Afinidade baseada em tags	O RNA de interesse é marcado com sequências de oligoribonucleótidos modificadas (aptâmeros) que se ligam fortemente a resinas de sephadex e estreptavidina.	Permite o isolamento de RNA a partir de células lisadas. Metodologias sólidas usando tags de afinidade com base em interações biológicas inerentes. Marcadores de afinidade. Rendimentos elevados devido à seleção específica das tags que possuem afinidade elevada para as resinas.	São necessárias etapas de purificação sequenciais para uma recuperação elevada, Uso de condições desnaturantes na recuperação, Vários problemas na inserção da marcação de afinidade no RNA.
Aminoácidos - RNA	Termofila <i>Tetrahymena</i> M4 imobilizada numa matriz ou numa coluna de afinidade comercial de Ni ²⁺ que vai reconhecer especificamente as marcas de afinidade incorporadas na molécula de RNA de interesse. Várias interações ocorrem entre os aminoácidos de histidina e arginina imobilizados e a molécula de RNA.	Alternativa eficaz para a purificação preparativa por PAGE de RNA, preparado por transcrição <i>in vitro</i> , Metodologias sólidas usando tags de afinidade com base em interações biológicas inerentes. Altos rendimentos de recuperação.	Exigência de elevadas concentrações de sal (para matrizes com o aminoácido de histidina imobilizado).

3.1.4.1 Cromatografia de afinidade com aminoácidos imobilizados

O princípio cromatográfico de afinidade com aminoácidos imobilizados tem sido estudado como uma boa alternativa aos métodos clássicos. Este método cromatográfico tem por base as interações naturais que ocorrem entre os aminoácidos e os ácidos nucleicos num ambiente celular, explorando assim os processos biológicos [36,37].

O processo de purificação ocorre através das ligações bioespecíficas dos aminoácidos que reconhecem especificamente as biomoléculas alvo, por meio de interações reversíveis, isto é, interações electrostáticas, interações hidrofóbicas, forças de *van der Waals* e pontes de hidrogénio [37].

Os aminoácidos básicos (carregados positivamente) são usualmente mais utilizados nesta metodologia, tendo sido já usados como ligandos a histidina, arginina e lisina, como mostra a tabela 5. Em estudos recentes, foi usado o aminoácido de arginina como um ligando específico para o desenvolvimento de um processo de purificação da molécula de RNA (figura 8), que demonstrou ser capaz de isolar e manter o RNA puro, intacto e com a qualidade adequada [35].

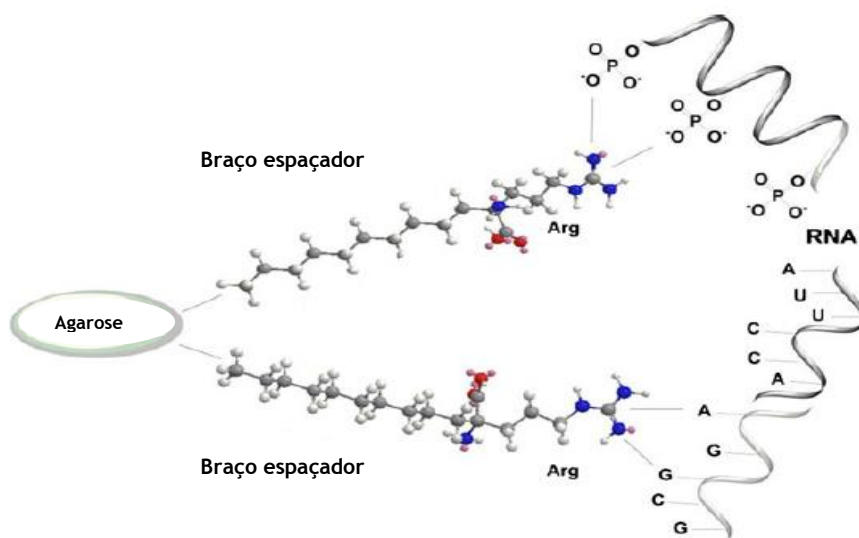


Figura 8 - Imagem representativa da interação das moléculas de RNA com a matriz de agarose-arginina (Arg). Dependendo da conformação do RNA a arginina tanto faz ligação com os grupos fosfato do RNA como com as suas bases (adaptado de [35]).

Outros estudos que envolvem a utilização destes aminoácidos demonstraram que a histidina promove uma interação mais forte com a molécula de RNA, o que pode estar correlacionado com a sua estrutura de cadeia simples que favorece a exposição e o maior acesso às bases do nucleótido [43].

A tabela seguinte apresenta uma caracterização dos diferentes ligandos, referindo as suas condições gerais de interação, a afinidade relativa de ligação com diferentes biomoléculas e a aplicação geral desses ligandos.

Tabela 5 - Caracterização das interações entre aminoácidos básicos e ácidos nucleicos na cromatografia de afinidade (adaptado de [43]).

Ligando - aminoácido	Condições de interação global	Interação relativa	Aplicação geral
Histidina	Elevadas concentrações de sal para promover a retenção dos ácidos nucleicos.	RNA - pDNA sc- gDNA - oc pDNA	Isolamento das isoformas de pDNA e purificação de pDNA sc de lisado.
Arginina	Os ácidos nucleicos interagem e ligam-se à matriz com baixas concentrações de sal.	sc pDNA - RNA - gDNA - oc pDNA	Isolamento das isoformas de pDNA e purificação de pDNA sc de lisado.
Lisina	Os ácidos nucleicos interagem e ligam-se à matriz com baixas concentrações de sal.	pDNA sc - pDNA oc	Isolamento das isoformas de pDNA.

3.2 Purificação com Monolitos

Presentemente, a cromatografia usando suportes monolíticos é vista por diversos grupos de investigação como um método de purificação vantajoso, inovador e bastante promissor, que passa pela utilização de novos suportes cromatográficos que apresentam características estruturais específicas, o que os torna numa excelente solução para a purificação de diversas biomoléculas de grandes dimensões [44,45].

Os monolitos são considerados uma nova classe de fases estacionárias, completamente diferentes quando comparadas com as fases estacionárias convencionais (de empacotamento), sendo deste modo, considerados a “quarta geração” dos suportes cromatográficos [46,47].

Uma característica importante dos monolitos é a elevada transferência de massa, conseguida através da sua estrutura tridimensional de canais porosos e interconectados, que vai permitir assim uma elevada capacidade de ligação para biomoléculas de maiores dimensões, devido à sua elevada área de superfície [47,48].

Além disso, outras vantagens estão associadas ao facto de os ensaios cromatográficos decorrem em condições de pressão mais baixas, o tempo de ensaio é mais reduzido e não há necessidade de desempacotamento no caso de surgirem bolhas de ar no seu interior.

4. Importância da estabilidade da molécula de RNA

Como referido, nos últimos anos a investigação em torno da molécula de RNA tem conduzido a importantes descobertas biológicas e motivado o desenvolvimento de novas tecnologias terapêuticas com base na avaliação e/ou aplicação de RNA [10].

Para ser considerada a sua aplicação como um produto terapêutico, o RNA deve apresentar um grau de pureza de aproximadamente 99% (exigidas pela agências reguladoras, como a FDA) e de estar intacta, de forma a garantir a atividade biológica. No entanto, o seu isolamento e purificação são passos críticos devido à possibilidade de degradação do RNA associada à sua manipulação, limitando o sucesso da aplicação do RNA em investigações subsequentes [10].

Portanto, manter a estabilidade desta molécula a nível estrutural é bastante importante, de forma a preservar a sua atividade biológica. A estabilização da molécula de RNA e de todas as outras macromoléculas (como proteínas e DNA) é altamente desejável, para um posterior armazenamento da molécula na sua conformação nativa [49].

Atualmente, têm sido desenvolvidos estudos em torno de diferentes classes de aditivos/excipientes, como é o caso dos sais, aminoácidos e açúcares de forma a manter a estabilidade da molécula. No entanto, já se encontram descritos na literatura diversos estudos de estabilidade da molécula de RNA recorrendo a iões metálicos [50].

4.1 Iões metálicos e estabilidade dos ácidos nucleicos

A integridade estrutural e a atividade biológica dos ácidos nucleicos podem estar dependentes da interação estabelecida com agentes do meio/solução, sendo atribuído um papel crucial às interações electrostáticas. A repulsão electrostática ocorre entre os grupos aniónicos dos fosfatos que se encontram estritamente empacotados na estrutura dos ácidos nucleicos, levando à abertura da estrutura como consequência desta repulsão [51].

Diversos estudos já desenvolvidos conseguiram demonstrar a importante contribuição dos iões metálicos para a estabilidade estrutural dos ácidos nucleicos, nomeadamente os catiões monovalentes (como o potássio e o sódio) e os iões divalentes (como o magnésio), que revelaram ser essenciais na estabilidade de grandes moléculas de RNA (figura 9), formando estruturas complexas e compactas [52]. Estes catiões são fundamentais para neutralizar as cargas negativas sobre as cadeias principais reduzindo as interações repulsivas de Coulomb entre os grupos fosfato [53].

Embora os catiões divalentes estejam presentes em concentrações mais baixas *in vivo* são particularmente importantes para esta função, uma vez que interagem mais fortemente com a carga negativa dos ácidos nucleicos [51]. As propriedades iónicas, tais como a concentração

iónica, a carga e o tamanho do íon, são extremamente relevantes para a estabilização da molécula, daí o magnésio (Mg^{2+}) ser particularmente apropriado para neutralizar a carga dos fosfatos do RNA, pois revela ser o catião divalente mais abundante intracelularmente e possui a maior densidade de carga de todos os íões biologicamente disponíveis [52,53].

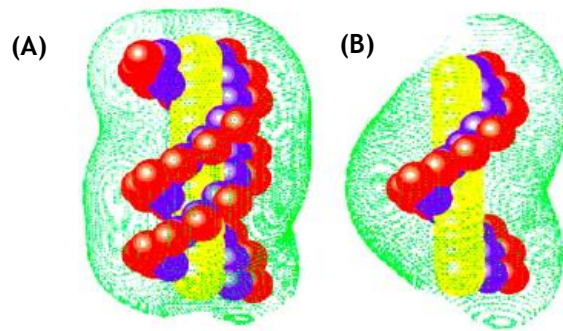


Figura 9 - Imagem representativa das regiões de fortes ligações em torno da dsRNA (A) e ssRNA (B). As esferas a vermelho representam os grupos fosfato e os pontos verdes representam os pontos sobre os limites das regiões fortemente ligadas. RNA numa solução de 10 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (adaptado de [50]).

4.2 Estabilidade da molécula de RNA por adição de diferentes classes de aditivos

As biomoléculas são extremamente instáveis sob diversas condições (como temperatura e pH), necessitando de excipientes adequados para as estabilizar e prevenir a desnaturação. A determinação das formulações para biomoléculas tem sido até aos dias de hoje um princípio empírico, utilizando os conhecimentos já existentes e transferi-los para a aplicação em novas moléculas, como é o caso do RNA. Na formulação de biomoléculas terapêuticas, é relevante o estudo do tipo e da concentração de excipiente, por forma a melhorar a formulação, estabilizando a natureza da molécula em estudo ou suprimindo os estados de desnaturação e agregação [54].

Assim, uma diversidade de excipientes pode ser introduzida em diversas formulações, com o objetivo de aumentar a estabilidade da macromolécula durante o seu processo de produção, manuseamento, biodisponibilidade e entrega celular [55]. A tabela 6 descreve resumidamente as classes de excipientes mais utilizados para a estabilização de macromoléculas com fim terapêutico.

Tabela 6 - Aditivos comumente utilizados para a estabilização de macromoléculas (adaptado de [55,59]).

Classe de aditivos	Exemplos
Aminoácidos	Arginina, histidina, prolina, glicina, alanina, lisina, metionina, ácido aspártico e ácido glutâmico.
Açúcares	Trealose, sacarose, sorbitol, maltose, frutose, lactose e glucose.
Sais	Sulfato de sódio, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, acetato de sódio, lactato de Sódio, succinato de sódio e fosfato de potássio.
Surfactantes	Poloxamer 407 e 188, polisorbato 80 e 20, Octoxinol-9, polioxietileno-23 e 20, álcool lauryl e sulfato de sódio lauryl.
Polióis	Ciclodextrinas, manitol, sorbitol, glicerol, xilitol e inositol.
Antioxidantes	Ácido ascórbico e glutatona.
Polímeros	Polietileno glicol, dextran e polivinilpirrolidone.
Agentes quelantes	EDTA, TRIS, inositol e hexafosfato.

Em suma, o presente estudo focou-se essencialmente nas três classes mais importantes de aditivos, nomeadamente sais, aminoácidos e açúcares.

4.2.1 Sais

O efeito dos sais na estabilidade de diversas biomoléculas pode ser difícil de avaliar, em grande parte devido às interações iônicas complexas que ocorrem entre as superfícies totalmente expostas das biomoléculas (como proteínas e ácidos nucleicos), que podem ser interações de natureza específica ou não-específica [55,56].

Os sais podem assim, estabilizar, desestabilizar, ou não terem qualquer efeito sobre a estabilidade da biomolécula em si, dependendo diretamente do tipo e da concentração do sal usado como aditivo e da natureza das interações iônicas [56].

Dependendo do tipo de interação, um sal pode aumentar a estabilidade térmica, aumentar a solubilidade e reduzir a extensão de agregação, no entanto, as biomoléculas, nomeadamente as proteínas, podem também desnaturar na presença de elevadas concentrações de sal [55]. Todavia, o aumento da estabilidade das proteínas deve-se ao aumento da tensão superficial e

do potencial químico do sistema promovido pelo sal, porém em estado liofilizado a estabilidade é reduzida devido à cristalização dos sais [49].

Em baixas concentrações, os sais afetam as interações electrostáticas e enfraquecem as repulsões iônicas, logo este efeito pode ser de estabilização quando existem principalmente interações repulsivas, ou de desestabilização quando há estabilidade entre as biomoléculas e o sal [56].

Como já foi mencionado anteriormente, estes excipientes promovem a estabilidade da estrutura nativa dependendo da concentração usada, neste caso, as concentrações podem ir desde 0,1 M até concentrações superiores a 1 M [49].

Um dos sais usados neste estudo de estabilidade da molécula de RNA foi o EDTA, que pode igualmente ser considerado como um agente quelante, promovendo a estabilização das biomoléculas e protegendo-as da oxidação por metais ou fotólise [57].

Assim, inicialmente para este estudo foram usados três sais diferentes (EDTA, citrato de sódio e acetato de sódio), com três concentrações diferentes (1 mM, 25 mM e 100 mM), de forma a avaliar a estabilidade do RNA continuamente sob diferentes condições de temperatura. A tabela 7 sintetiza as principais vantagens e limitações destes aditivos.

Tabela 7 - Principais vantagens e limitações da utilização de sais como excipientes (adaptado de [58]).

Sais	Vantagens	Limitações
EDTA, cloreto de sódio, sulfato de sódio e cloreto de potássio	- Agentes tonificantes; - Estabilização ou efeitos desestabilizadores sobre proteínas, especialmente com aniões.	- Dependentes da concentração; - Podem causar oxidação; - Podem ser corrosivos para superfícies metálicas.

4.2.2 Aminoácidos

Hoje em dia, os aminoácidos são amplamente utilizados em aplicações biotecnológicas. Uma vez que os aminoácidos são compostos naturais, estes podem ser usados com alguma segurança em aplicações farmacêuticas, por exemplo, como excipientes para formulações de diversas biomoléculas e como aditivos num dado solvente para a etapa de purificação. Além de serem úteis para um aumento da pressão osmótica intracelularmente, os aminoácidos são muito usados com o objetivo de aumentar e melhorar a estabilidade das biomoléculas, após a etapa de isolamento [59].

Recentemente, esta classe de aditivos, em particular o ácido aspártico, o ácido glutâmico, a glicina, arginina e lisina, tem sido aplicada a uma grande variedade de produtos farmacêuticos, para reduzir/evitar o estado de agregação. Além disso, os aminoácidos foram estudados para serem úteis como agentes quelantes (formação de complexos), reduzirem a adsorção superficial e para aumentarem a estabilidade térmica das proteínas [55].

Adicionalmente, foi também possível comprovar em estudos recentes que determinadas degradações químicas que ocorrem em proteínas, podem ser reduzidas na presença de certos aminoácidos [56].

Os aminoácidos possuem assim a capacidade fulcral de estabilizar diversas biomoléculas por uma variedade de mecanismos, incluindo hidratação preferencial, ligação espontânea com a biomolécula, capacidade de tamponamento ou com propriedades antioxidantes (como a metionina e a histidina) [56,59].

Os aminoácidos mais utilizados como estabilizadores incluem a histidina, arginina (altamente eficaz na supressão da agregação de proteínas) e a glicina. A histidina tem sido extensivamente utilizada como um agente de tamponamento para proteínas, e como já mencionado, além de controlar o pH, pode igualmente desempenhar a função de antioxidante, eliminando os grupos radicais hidroxilo em solução [49,59].

No presente estudo de estabilidade do RNA, os aminoácidos estudados foram, a histidina, arginina e a prolina sob diferentes concentrações (1 mM, 25 mM e 100 mM). A tabela 8 apresenta concisamente as principais vantagens e limitações destes aditivos.

Tabela 8 - Principais vantagens e limitações da utilização dos aminoácidos como excipientes (adaptado de [58]).

Aminoácidos	Vantagens	Limitações
Histidina, arginina, prolina, glicina, lisina e metionina	<ul style="list-style-type: none">- Interações específicas com proteínas e ácidos nucleicos;- Antioxidantes (His e Met);- Agentes de tamponamento e tonificantes.	-

4.2.3 Açúcares

Os açúcares são frequentemente utilizados como estabilizadores de proteínas em formulações liofilizadas e líquidas, que neste caso, vão recriar condições biológicas [56].

Em estudos recentes, foi possível comprovar que os açúcares possuem a capacidade de proteger as biomoléculas contra a desnaturação e são especialmente utilizados como agentes crioprotectores [55].

Contudo, a presença dos açúcares pode não ser adequada para todas as condições, isto é, se forem estabelecidas interações hidrofóbicas entre a biomolécula e os açúcares, que dependem da temperatura, estas interações serão privilegiadas para elevadas temperaturas, o que pode significar diminuição significativa da atividade da biomolécula. Todavia, para uma estabilidade ótima a longo prazo, já foram efetuados estudos com diversos dissacáridos, onde foi comprovado que os mais indicados são a trealose e a sacarose (liprotector) [55,59]. Por outro lado, os álcoois de açúcar, tais como o sorbitol, podem ser igualmente utilizados para a

estabilização de biomoléculas em solução ou em estado liofilizado. Porém o sorbitol não é adequado quando as condições de armazenamento requerem temperaturas negativas, devido à formação de cristais [58].

Como já referido anteriormente, o efeito de estabilização depende da concentração usada. No caso específico dos açúcares, uma concentração de 0,3 M (ou 5%) tem sido sugerida como a concentração mínima para se conseguir uma estabilização significativa das biomoléculas. Ainda assim, tem sido sugerida a concentração de 1 M (ou 10%) de sacarose para proteger a atividade de diversas biomoléculas durante o seu processo de isolamento [56].

De facto, alguns estudos demonstraram que os açúcares presentes em concentrações elevadas durante a etapa de purificação podem ser eficazes na preservação da atividade das biomoléculas [49].

Para o desenvolvimento do estudo da estabilidade da molécula de RNA, foi então usada a trealose, a sacarose e também o sorbitol em diferentes concentrações (295 mM e 590 mM). A tabela 9 apresenta as vantagens e principais limitações destes aditivos.

Tabela 9 - Principais vantagens e limitações da utilização dos açúcares como excipientes (adaptado de [58]).

Açúcares	Vantagens	Limitações
Trealose, sacarose e sorbitol	<ul style="list-style-type: none">- Estabilizadores de biomoléculas em estado líquido e liofilizado;- Agentes tonificantes.	<ul style="list-style-type: none">- Os açúcares redutores reagem com as proteínas originando proteínas glicosiladas;- Açúcares não redutores podem hidrolisar formando açúcares redutores.

O presente estudo, irá contribuir para a determinação das melhores condições de armazenamento (temperatura, concentração de aditivo e tempo de armazenamento) do RNA, por forma a garantir a sua atividade biológica, o que representa uma vantagem quando se considera a aplicação terapêutica da molécula.

4.3 Técnicas convencionais para a avaliação da estrutura do RNA

A espectroscopia eletrónica abrange uma ampla gama de métodos, incluindo a espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular (DC) e UV/visível, que permitem fazer uma avaliação da estrutura das biomoléculas. Estas técnicas são ferramentas poderosas para o estudo das interações das biomoléculas com os excipientes e fornecem principalmente informações relativas ao efeito do ambiente circundante na biomolécula. A exceção notável é que a técnica de DC permite também fazer a caracterização das estruturas secundárias das biomoléculas, como é o caso da molécula de RNA [58].

Porém, outra técnica baseada em espectroscopia vibracional é designada por Transformada de Fourier (FTIR), e permite fazer também uma caracterização (a nível químico) da estrutura das biomoléculas [58].

4.3.1 Dicroísmo Circular (DC)

Devido à necessidade de compreender os mecanismos biológicos, há um crescente interesse no conhecimento das biomoléculas, tornando-se extremamente relevante o estudo das suas mudanças estruturais em diferentes condições ambientais, para uma melhor compreensão da sua função. Daí a técnica de DC ser cada vez mais valiosa e reconhecida para a análise da estrutura de biomoléculas em solução [60]. A espectroscopia DC fornece a informação das estruturas secundárias e terciárias de diversas biomoléculas, como é o caso da molécula de RNA [58].

Esta técnica é caracterizada pela diferença de absorção de luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, fornecendo um espectro característico da amostra em análise, sendo que, a análise da estrutura de cada biomolécula deverá ser realizada para um determinado intervalo de comprimento de onda, onde a biomolécula apresenta o seu espectro, correspondendo à sua elipticidade [61].

No caso particular da molécula de RNA o seu espectro padrão característico apresenta uma banda negativa a 215 nm e uma banda positiva a 265 nm (figura 10), o que permite fazer uma avaliação da estrutura ou das suas alterações conformacionais, pela análise comparativa com o espectro padrão [62].

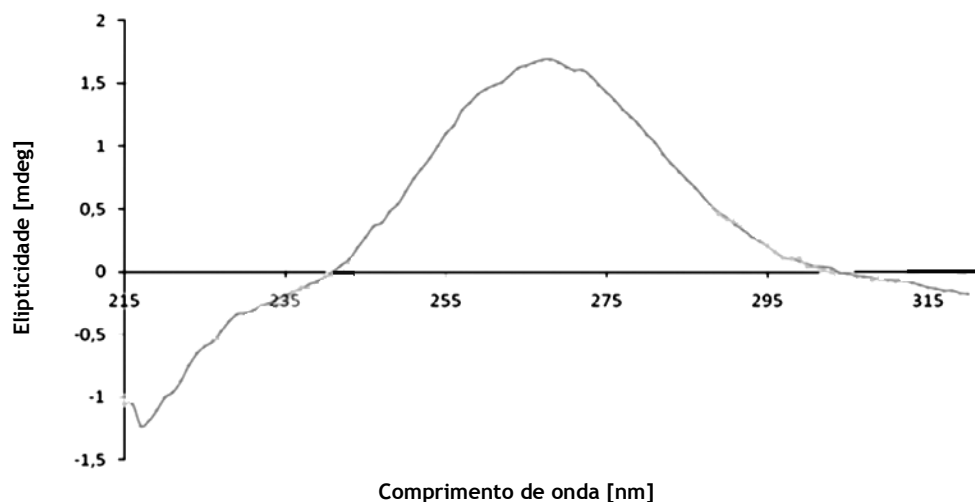


Figura 10 - Espectro padrão de RNA em H₂O-DEPC. O espectro apresenta as bandas características da molécula de RNA, ou seja, banda negativa a 215 nm e positiva a 265 nm (adaptado de [62]).

No entanto, para uma análise mais completa esta técnica pode ser então combinada com a tecnologia de FTIR [58].

Neste estudo, a técnica de DC foi utilizada com o objetivo de estudar a estrutura e alterações conformacionais da molécula de RNA sob diferentes condições de armazenamento, nomeadamente diferentes temperaturas e tempos de armazenamento, tipos de aditivos e suas concentrações.

4.4 Estabilização do pre-miR-29 após isolamento e purificação para posterior aplicação terapêutica

Como já citado anteriormente, diversos estudos realizados na última década têm vindo a revelar um interesse cada vez maior por sequências genómicas não-codificantes, incluindo várias classes de RNA não-codificante, tais como os microRNAs (miRNAs) [63].

Os miRNAs constituem uma classe de pequenos RNAs, que funcionam como reguladores da expressão génica através de um mecanismo intracelular altamente conservado, designado de RNA de interferência (RNAi) [25].

Atualmente, o miRNA é considerado uma poderosa ferramenta, estando diretamente envolvido na regulação de muitas funções biológicas. Assim, a compreensão do papel dos miRNAs no processo celular é fundamental para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico ou de novos biofármacos para o tratamento de diversas doenças, como é o caso das doenças neurodegenerativas [36].

Várias características patológicas da doença de Alzheimer (DA) foram reconhecidas e associadas à desregulação de muitos miRNAs, em específico do miRNA-29a/b-1, que se encontra diminuído em doentes de Alzheimer. Associado também a estes baixos níveis de miRNA, foi detetada uma sobreexpressão da proteína β -secretase 1 (BACE 1) (figura 11) [37].

Em estudos recentes, *in vitro*, foi demonstrado que de facto, o miR-29 está envolvido na regulação da expressão da enzima BACE 1, responsável pela clivagem da proteína precursora amilóide (APP), que promove a acumulação subsequente de placas β -amilóide no espaço extracelular [36,64]. Assim, estes estudos levantam a possibilidade de usar o miR-29 como um potencial alvo terapêutico para a terapia da DA. No entanto, para obter o pre-miR-29 como um produto adequado para futuras aplicações terapêuticas, é necessário garantir além do seu grau de pureza, a sua estabilidade e integridade [36].

No presente trabalho, serão testadas as melhores condições de estabilidade associadas à utilização dos aditivos em estudo, de forma a avaliar também o aumento de estabilidade e de atividade biológica do pre-miR-29, fazendo um paralelismo com estudos de transfeção já iniciados pelo grupo de investigação.

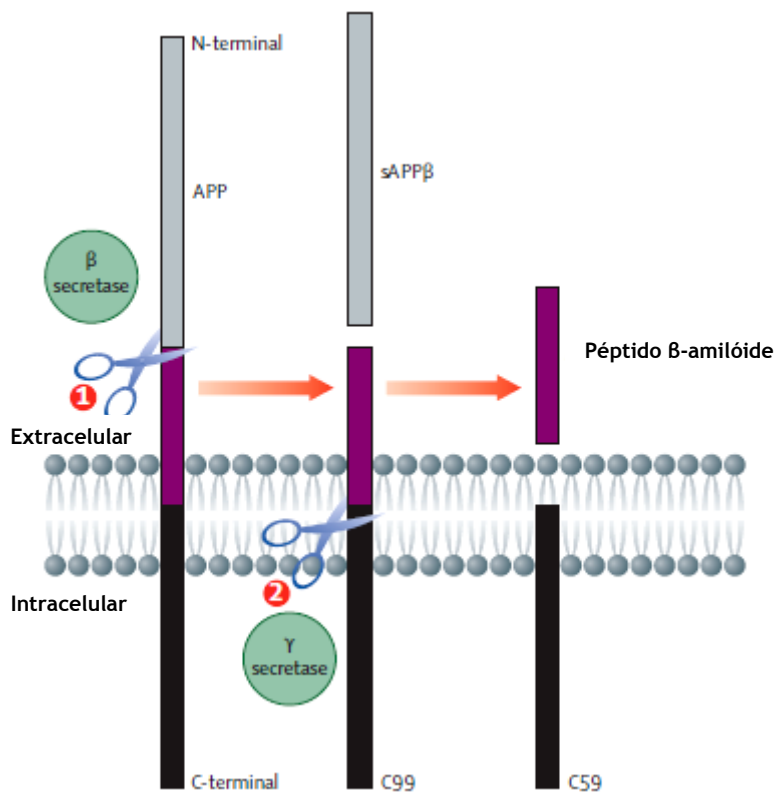


Figura 11 - Fatores que afetam o processamento e clivagem da APP. (1) Em primeiro lugar, a enzima β- secretase 1 (BACE 1) cliva a APP para criar o N-terminal. Dois fragmentos de APP são produzidos: C99 ligado à membrana e a sAPPβ (cinzento) que é segregada. Em segundo lugar, o composto C99 é clivado pela γ- secretase (2) para gerar o C-terminal. O péptido β-amilóide (púrpura) é então libertado para o espaço extracelular. Um domínio C59 (preto) é também produzido neste processo (adaptado de [65]).

Capítulo 2

Materiais e Métodos

1. Materiais

Para o crescimento em cultura da bactéria *Rhodovulum sulfidophilum* DSM 1374 (BCCM/LMG, Bruxelas, Bélgica), utilizou-se extrato de levedura e triptona, adquiridos na Biokar (Beauvais, França), NaCl da VWR (Randor, Pensilvânia, EUA), K_2PO_4 e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ obtidos na Panreac (Barcelona, Espanha), $MgSO_4$, KH_2PO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e glucose da Sigma-Aldrich (St Louis, Mo, EUA), ácido bórico (H_3BO_3) e Canamicina da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA), e o ágar usado no meio sólido foi comprado na Pronalab (Mérida, Yucatán). Para o crescimento celular da bactéria *Escherichia coli* (Invitrogen) DH5a, foi usado extrato de levedura e triptona, obtidos na Bioakar (Beauvais, França), glicerol, da VWR Prolabo (França), sais (KH_2PO_4 e K_2HPO_4) e ágar usado no meio sólido foram adquiridos na Pronalab (Mérida, Yucatán). Os reagentes usados na extração de RNA/lise celular, foram β -mercaptoetanol, acetato de sódio e clorofórmio da Merck (Darmstadt, Alemanha), isopropanol da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA), citrato de sódio, tiocianato de guanidina e sarcosyl da Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EUA), o fenol e o NaCl foram adquiridos na VWR (Randor, Pensilvânia, EUA). Todas as soluções usadas na extração de RNA foram previamente preparadas utilizando 0,05% de água tratada com Pirocarbonato de dietilo (DEPC) da Fluka (Sigma-Aldrich - St Louis, MO, EUA). Os ensaios cromatográficos foram efetuados a partir de uma matriz de L-Metionina-agarose adquirida na Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EUA) e uma matriz de L-arginina-Sepharose 4B (Amersham Biosciences). Os sais sulfato de amônio e Tris (hidroximetil) aminometano (Tris), utilizados como tampões de eluição, foram obtidos da Panreac (Barcelona, Espanha) e da Merck (Darmstadt, Alemanha), respectivamente. No estudo da estabilidade do RNA total, foram usados como reagentes o EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) obtido da VWR (Randor, Pensilvânia, EUA), citrato de sódio e acetato de sódio da Merck (Darmstadt, Alemanha), L-histina, L-arginina, prolina, trealose e sorbitol, adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EUA) e sacarose da Thermo Fischer Scientific Inc. (Waltham, EUA), todas as soluções foram preparadas com água desionizada ultra pura, purificada com o sistema Milli-Q da Milipore (Billerica, MA, EUA), tendo sido previamente autoclavada. Os ensaios no Dicroísmo Circular foram realizados com uma célula de quartzo retangular, com um percurso ótico de 1 mm (Hellma analysis, Alemanha). O material usado no decorrer de todo o procedimento experimental, foi previamente autoclavado.

2. Métodos

2.1 Condições de crescimento de *R. sulfidophilum* DSM 1374

O RNA de baixo peso molecular o pre-miR29b-1, usado neste estudo foi obtido de uma cultura celular de *R. sulfidophilum* DSM 1374, que é uma bactéria fotossintética marinha, com capacidade para produzir RNAs com um elevado rendimento [66],[67]. A bactéria foi previamente transformada com o plasmídeo pBHSR1-RM de 4065 pb (geneticamente modificado com a sequência do pre-miR29b-1), por choque térmico. Para a seleção das bactérias transformadas com o plasmídeo, foi feito o seu pré-cultivo em meio sólido (5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de glucose, 20 g/L de NaCl, 4,1 g/L de MgCl₂, 10 g/L de polipeptona e 15 g/L de ágar suplementado com 1mg/L de ZnSO₄.H₂O, 10 mg/L MnO₄S.4H₂O, 10 mg/L FeSO₄.7H₂O e 30 µg/mL de canamicina). Após seleção das bactérias transformadas o crescimento celular efetuou-se a 30°C, sob agitação a 250 rotações por minuto (rpm), em condições aeróbicas com ausência de luz em 50 mL de meio de cultura (10 g/L de triptona, 500 mg/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH₂PO₄, 4 g/L de K₂HPO₄, 30 g/L de NaCl, 10 g/L de glucose suplementado com 1 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/L de MgSO₄, 0,05 g/L de CaCl₂.2H₂O e 30 µg/mL de canamicina). O meio líquido foi suplementado com uma solução de sais (5,56 g/L de FeSO₄.7H₂O, 3,96 g/L de Cl₂CuH₄O₂, 5,62 g/L de CoSO₄.7H₂O, 0,34 g/L de CuCl₂.2H₂O, 0,58 g/L de ZnSO₄.7H₂O, 0,6 g/L de H₃BO₃, 0,04 g/L de NiCl₂.6H₂O e 0,06 g/L de Na₂MoO₄.2H₂O, dissolvidos em 0,5 M de HCl), considerando que para 100 mL de meio foram adicionados 100 µL de solução de sais. O crescimento celular foi interrompido quando atingiu uma densidade ótica (DO) a 600 nm de aproximadamente 2,6. A fermentação, de 100 mL de meio de cultura, foi iniciada com uma DO de 0,2 através da transferência do volume adequado da pré-fermentação. Após 72 h de fermentação as células foram recuperadas por centrifugação e armazenadas a -20°C.

2.2 Condições de crescimento de *E. coli* DH5a

O RNA total (RNAt) foi obtido de uma cultura celular de *E. coli* DH5a. O crescimento celular foi efetuado a 37°C, num agitador orbital a 250 rpm, utilizando como meio de crescimento o Terrific Broth (TB) (20 g/L de triptona, 24 g/L de extrato de levedura, 4 mL/L de glicerol, 0,017 M de KH₂PO₄ e 0,072 M de K₂HPO₄). O crescimento foi interrompido no final da fase log, (DO₆₀₀ ≈ 9). As células foram recolhidas por centrifugação a 3 900 g, durante 10 minutos (min), a 4°C e armazenadas a -20°C.

2.3 Lise e Isolamento de pequenos RNAs e RNA total

Os RNAs de baixo peso molecular e o RNA total foram obtidos utilizando o método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio, com base no protocolo já descrito por Chomczynski e co-autores (2006) [32]. A extração iniciou-se com a ressuspensão dos pellets celulares em 20 mL de NaCl a 0,8%, com agitação no vórtex e centrifugação a 6000 g durante 10 min a 4°C. Os pellets resultantes da centrifugação foram ressuspensos através de pipetagens sucessivas, utilizando 5 mL de solução D (4 M de tiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sódio, pH 4,0, 0,5% (w/m) de N-laurosarcosil (sarcosyl) e 0,1 M de β -mercaptoetanol), para a realização da lise das células. Após incubação em gelo durante 10 min foi adicionado ao lisado celular 500 μ L de acetato de sódio 2 M, a pH 4,0 e 5 mL de fenol saturado em água, agitando gentilmente esta mistura. Este passo vai permitir a precipitação de proteínas, gDNA e de detritos celulares. Para o isolamento do RNA é então adicionado 1 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (49:1), agitando vigorosamente de modo a obter duas fases imiscíveis, seguindo-se 15 min de incubação em gelo e centrifugação a 10 000 g durante 20 min a 4°C. Após o passo de centrifugação, a fase aquosa rica em RNA é recolhida e concentrada com a adição de 5 mL de isopropanol (-20°C), seguindo-se um passo de centrifugação a 10 000 g durante 20 min a 4°C. O pellet obtido que contém o RNA, é novamente ressuspenso em 1,5 mL de solução D (agitação no vórtex) e concentrado pela adição de 1,5 mL de isopropanol (-20°C). Seguidamente à centrifugação de 10 min a 10 000 g a 4°C, são adicionados 2,5 mL de etanol a 75 % preparado em água DEPC ao pellet resultante para efetuar a lavagem do RNA presente, com incubação à temperatura ambiente durante 15 min e posterior centrifugação a 10 000 g, durante 5 min a 4°C. Por último, os pellets são secos ao ar durante 10 min e em seguida ressuspensos em 1 mL de água tratada com 0,05 % de DEPC. Por fim, é feita a quantificação da concentração de RNA e da sua pureza utilizando-se um espectrofotómetro, o Nanodrop, efetuando-se posteriormente uma eletroforese em gel de agarose.

2.4 Eletroforese em gel de agarose

O RNA obtido na extração é analisado por eletroforese em gel de agarose, para determinar a sua pureza e estabilidade. Esta técnica consiste numa eletroforese horizontal de 15 cm de comprimento, com gel de agarose 0,8% (Hoefer, San Francisco, CA, EUA), e corado com green-safe (1 μ g/mL) adquirido na NZYTech (Lisboa, Portugal). A electroforese é efetuada a 110 V e a 400 mA durante 30 min em tampão TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA, pH 8,0), preparado em água tratada com DEPC. O gel é diretamente visualizado numa câmara de ultravioleta (UV), num sistema Vilber Lourmat (ILC Lda, Lisboa, Portugal).

2.5 Cromatografia de Afinidade

Nos ensaios cromatográficos foram usadas amostras de RNA (que contêm RNA 6S, pre-miR-29 e outros sRNA, incluindo tRNAs), provenientes das extrações a partir da bactéria *R. sulfidophilum* DSM 1374, com o objetivo de purificar o pre-miR-29. Os estudos cromatográficos foram realizados no sistema ÄKTA AVANT, que é constituído por um coletor de frações refrigerado, por uma unidade de separação e um computador com o Software UNICORN™ 6.1 (GE Healthcare, Biosciences Uppsala, Suécia), ao qual foi acoplado uma coluna de 10 mm de diâmetro x 20 mm de comprimento, empacotada com 1,6 mL de gel comercial de L-Metionina-agarose (Sigma-Aldrich). Este suporte é caracterizado como uma matriz de agarose 4%, com um espaçador de 1 átomo e uma densidade de ligandos entre 2 e 10 $\mu\text{mol/mL}$. Os tampões de eluição foram previamente filtrados, através de uma membrana com um tamanho de poro de 0,20 μm (Schleicher Schuell, Dassel, Alemanha) e sonicados através de ultra-sons. Para a purificação do pre-miR-29 foi aplicada a estratégia de eluição com um gradiente decrescente de sulfato de amónio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). A coluna cromatográfica foi equilibrada com 1,7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em tampão 10 mM Tris-HCl (pH 6,0) com um caudal de 1 mL/min. A amostra de RNA (200 μg) resultante da extração foi injetada na coluna usando um loop de 100 μL nas mesmas condições de fluxo. Após a eluição das espécies não ligadas, a força iónica foi diminuída gradualmente para 1,3 M e 0 M, respetivamente, em tampão 10 mM Tris-HCl (pH 6,0). A absorvância das frações eluídas foi continuamente monitorizada a 260 nm e todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente. As frações foram recolhidas de acordo com os picos cromatográficos obtidos, concentradas e dessalinizadas com concentradores de 5000 MWCO da Vivaspin (Vivascience). No final, todas as amostras foram armazenadas (-80°C) para posteriores análises, e a coluna cromatográfica lavada com água Milli Q (filtrada e sonicada). Outra estratégia realizada para a purificação do pre-miR-29 foi a partir de uma coluna de 10 mm de diâmetro x 20 mm de comprimento, empacotada com 2 mL de um gel comercial de L-Arginina-Sepharose 4B (Amersham Biosciences). Este suporte é caracterizado como uma matriz de agarose 4%, com um espaçador de 12 átomos e uma densidade de ligandos entre 14 e 20 $\mu\text{mol/mL}$ [25]. Para a purificação do pré-miR-29 a estratégia de eluição aplicada foi com um gradiente crescente de cloreto de sódio (NaCl), de acordo com as condições previamente estabelecidas [25]. A coluna cromatográfica foi equilibrada com 280 mM de NaCl em tampão 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) com um caudal de 1 mL/min. A amostra de RNA (30 μg) resultante da extração foi injetada na coluna usando um loop de 100 μL sob as mesmas condições de fluxo [25]. A força iónica foi aumentada gradualmente para 360 e 500 mM em tampão 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), após a eluição das espécies não ligadas. As restantes condições e frações recolhidas foram tratadas da mesma forma que na estratégia anterior, à exceção da temperatura dos ensaios que foi à temperatura de 20°C, recorrendo a um banho termostatizado.

2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A integridade das amostras de RNA e identificação do sRNA presente nas frações recolhidas em cada ensaio cromatográfico foi possível através da realização de eletroforese vertical, que consiste num gel desnaturante de ureia e poliacrilamida. Todas as amostras (20 µL) foram previamente desnaturadas com formamida a 97,5%, 0,3% bromofenol, 10 mM EDTA a pH 7,5 e as condições desnaturantes foram mantidas no gel devido à presença de ureia 8 M. Em seguida, as amostras foram injetadas num gel de 10% de poliacrilamida em tampão TBE (0,84 M Tris base, 0,89 M ácido bórico e 0,01 M EDTA, pH 8,3), e a corrida foi realizada a 125 V durante 90 min. No final, os géis foram corados com green-safe (1 µg/mL) em tampão TBE (1:10) e posteriormente visualizados utilizando um sistema Vilber Lourmat (ILC Lda, Lisboa, Portugal). Para a realização desta eletroforese foi usado um sistema da Amersham Biosciences (GE Healthcare, Suécia) e uma fonte da Bio-Rad.

2.7 Dicroísmo Circular (DC)

A técnica do Dicroísmo Circular foi utilizada para avaliar continuamente a estabilidade conformacional da molécula de RNA total, após o processo de extração, quando sujeita a diferentes condições, tais como, uso de diferentes aditivos (sais, aminoácidos e açúcares), diferentes temperaturas de incubação (4°C, -20°C e -80°C), diferentes tempos de armazenamento (7, 15 e 30 dias) e ainda sob diferentes concentrações de cada aditivo usado. Seguidamente ao passo de extração, o RNA foi adicionado a uma solução de cada um dos estabilizadores, sendo realizada uma incubação prévia de 15 min antes da análise do espectro ou armazenamento em cada uma das condições descritas. Para este estudo, o equipamento utilizado foi o Jasco J-1850 Spectrophotometer (Jasco, Easton, MD, EUA) e uma célula de quartzo retangular (Hellman analysis, Alemanha) com um percurso ótico de 1 mm. Os espectros foram obtidos a uma velocidade de varrimento de 10 nm/min, com uma gama de absorvância entre 320-190 nm e a uma largura de banda espectral de 1 nm. A concentração das amostras de RNAt, foram calculadas após a quantificação da amostra no Nanodrop, de forma a saber a quantidade de RNA e aditivo a adicionar até se perfazer um volume final de 1,5 mL. O comportamento a nível conformacional da molécula de RNA, foi avaliado com os seguintes aditivos: EDTA (1, 25 e 100 mM), citrato de sódio (1, 25, 100 mM), acetato de sódio (1, 25, 100 mM), L-histidina (1, 25 e 100 mM), L-arginina (1, 25, 100 mM), prolina (1, 25, 100 mM), sacarose (295 e 590 mM), trealose (295 e 590 mM) e sorbitol (295 e 590 mM). Todas as soluções foram preparadas em água Milli Q autoclavada, no próprio dia da aquisição dos espectros e da incubação com o RNA extraído da *E. coli* DH5a. Para se efetuarem as medições, é recomendado ligar o equipamento 30 min antes da sua utilização, para se efetuar a purga do oxigénio com azoto, de forma a não haver oxidação das amostras em análise, este processo deve ser repetido no final da sua utilização [60]. Todos os ensaios foram então realizados sob um fluxo constante de azoto, para assim purgar o ozono que é gerado pela fonte de luz (lâmpada de xénon) do equipamento. Para todas as amostras analisadas, foi

efetuado um branco (apenas tampão sem RNA), que foi posteriormente subtraído em todas as corridas da amostra. Os dados foram recolhidos em duplicado (n=2) e as médias representadas num único espectro. No final de cada corrida, é retirado o ruído usando o Software Jasco J-1850, para se obter um espectro mais linear sem distorção dos picos da banda positiva e negativa características do RNA (265 e 215 nm respetivamente), e o sinal DC é convertido em elipticidade molar.

2.8 Cultura de células

Para os estudos de transfeção e avaliação da atividade do pre-miR-29b, foi utilizada a linha de células N2a695, e para o seu crescimento celular foi utilizado o meio com a seguinte composição: uma mistura (1:1) “*Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium*” (DMEM) e OptiMEM suplementado com 5% (m/v) de soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor e 1% (m/v) penicilina-streptomina. Estas células têm a capacidade de promover a expressão endógena da proteína humana BACE 1 (hBACE1), permitindo assim, uma maior sensibilidade para a deteção de alterações na expressão da hBACE 1 ao nível pós-transcricional. As células foram mantidas a 37°C num atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂.

2.9 Extração de RNA total a partir das células N2a695

Após a cultura das células N2a695, e quando foi atingida uma confluência entre 50 e 60%, foi realizada a transfeção das células com o pre-miR-29b, para posterior extração de RNAt. Nesta fase, o meio é removido e substituído por meio de cultura sem soro. Após 12h, os complexos de Lipofectamina/pre-miR-29b (Lip/pre-miR-29) foram preparados e adicionados às células, com uma concentração de 9,9 nM de pre-miR-29, e de seguida foi realizada a transfeção durante 6h. O meio de cultura foi posteriormente substituído por meio completo com 1% de FBS e 1% de antibiótico, para permitir que as células permaneçam metabolicamente ativas e expressem a hBACE1. As células não transfetadas foram usadas como controlos negativos e todas as experiências de transfeção foram realizadas em triplicado (n=3). Após 72h de transfeção, as células foram recolhidas para extração de RNA. O RNAt foi isolado com os reagentes TRIzol (Invitrogen) e clorofórmio, sendo ainda purificado por precipitação com isoporpanol e lavagem com etanol a 75%. A concentração de RNAt foi determinada utilizando um Nanofotómetro UV/Vis, e a sua integridade e qualidade avaliadas por eletroforese em gel de agarose. O RNA foi tratado com DNase I, para evitar contaminação genómica. A amplificação da cadeia complementar de DNA (cDNA) foi realizada usando o Kit RevertAid cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific Inc.), para um volume total de 20 µL contendo 1 µg de RNAt.

2.10 Avaliação dos níveis de expressão do mRNA da hBACE 1 por RT-qPCR

A análise quantitativa da expressão de mRNA da hBACE1, após transfeção das células com pre-miR-29b, foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), após a síntese de cDNA a partir do RNAt, utilizando o Kit Maxima® SYBR Green/Fluoresceína qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) num termociclador IQ5 da Biorad. Para a reação de PCR foi preparado um volume final de 20 µL contendo 10 µL de Maxima® SYBR Green/Fluoresceína qPCR Master Mix, 1,2 µL de cada um dos *primers* (5 mmol/µL) e 1 µL de cDNA. O ciclo foi realizado usando o seguinte protocolo: 5 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 62°C e 30 s a 72°C. A eficiência do RT-qPCR foi calculada com o auxílio do Software MyIQ 2.0 (BioRad). Já a quantificação relativa da expressão da BACE 1 foi baseada no método de ciclo limiar comparativo (CT), em que a quantificação do produto alvo foi determinada como sendo $2^{-(\Delta CT_{\text{alvo}} - \Delta CT_{\text{calibrador}})}$, normalizados para níveis de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) em relação às células de controlo não transfetadas. Os *primers* de iniciação utilizados nesta experiência foram 5'-AGACGCTCAACATCCTGGTG-3' (*forward*) e 5'-CCTGGGTGTAGGGCACATAC-3' (*reverse*) para a amplificação da hBACE1 e 5'-TGACGTGCCGCTGGAGAAA-3' (*forward*) e 5'-AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG-3' (*reverse*) para a amplificação de GAPDH.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

Nos últimos anos, tem vindo a ser cada vez mais reconhecida a importância da molécula de RNA em numerosos processos biológicos, e paralelamente, têm vindo a ser descritas e compreendidas mais funções para esta molécula [62,68]. Um dos papéis marcantes, recentemente identificado, consiste na sua participação generalizada na regulação de numerosos genes (com implicações em muitas doenças), o que sugere que há muito ainda por descobrir sobre esta molécula que tem sido hoje em dia intitulada como um componente celular surpreendente, nomeadamente sobre a sua potencial aplicação na área clínica [7,63]. Com o objetivo de utilizar a molécula de RNA para fins terapêuticos, é fundamental garantir e preservar a sua pureza, integridade e estabilidade [37]. Assim sendo, várias metodologias de purificação têm sido testadas para alcançar o grau de pureza adequado. No caso em concreto do pre-miR-29b-1, que tem sido estudado pelo grupo de investigação, a metodologia de purificação usada tem sido baseada na cromatografia de afinidade com aminoácidos imobilizados, tais como a lisina, arginina e a tirosina [25,36,37].

Neste trabalho, foram realizados alguns ensaios cromatográficos para avaliar a possibilidade de purificar o pre-miR-29b-1 usando a matriz de L-metionina-agarose. Para estes ensaios, foram inicialmente preparadas amostras de RNA provenientes da expressão recombinante em *R. sulfidophilum*.

1. Lise celular da bactéria *R. sulfidophilum* DSM 1374 e *E. coli* DH5a

Apesar de a bactéria *R. sulfidophilum* ter a capacidade de secretar ácidos nucleicos ativos para o meio extracelular, o que pode representar uma vantagem do ponto de vista de processo, a metodologia para a recuperação de RNA do meio ainda não foi estabelecida [69,70].

Assim, este trabalho centraliza-se nos RNAs de baixo peso molecular produzidos no ambiente intracelular, diminuindo também os riscos de destabilização e degradação da molécula de pre-miR-29b-1 em estudo.

Para a recuperação dos RNAs de baixo peso molecular produzidos e acumulados ao longo do crescimento da bactéria *R. sulfidophilum*, foi usado o método de isolamento baseado em tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio, já descrito anteriormente [32].

Após a extração dos RNAs de baixo peso molecular, é essencial proceder-se à avaliação da integridade das amostras de RNA e verificar se existe algum tipo de contaminação,

nomeadamente pela presença de gDNA, realizando uma eletroforese em gel de agarose. Este passo de avaliação é fundamental para a posterior aplicação da amostra no processo cromatográfico. Analisando a eletroforese em gel de agarose (figura 12) representativa do processo de recuperação de RNA, é possível confirmar que não existe contaminação de gDNA na amostra, observando-se apenas bandas intensas correspondendo aos RNAs de baixo peso molecular. Estas amostras foram então utilizadas no processo cromatográfico para testar a purificação do pre-miR-29b-1.

Este procedimento foi utilizado de igual forma para a extração intracelular do RNA proveniente da *E. coli* DH5a, para posteriores estudos de estabilidade no DC. A figura 12 apresenta assim a eletroforese em gel de agarose das duas extrações, demonstrando a integridade e a não contaminação das amostras com gDNA.

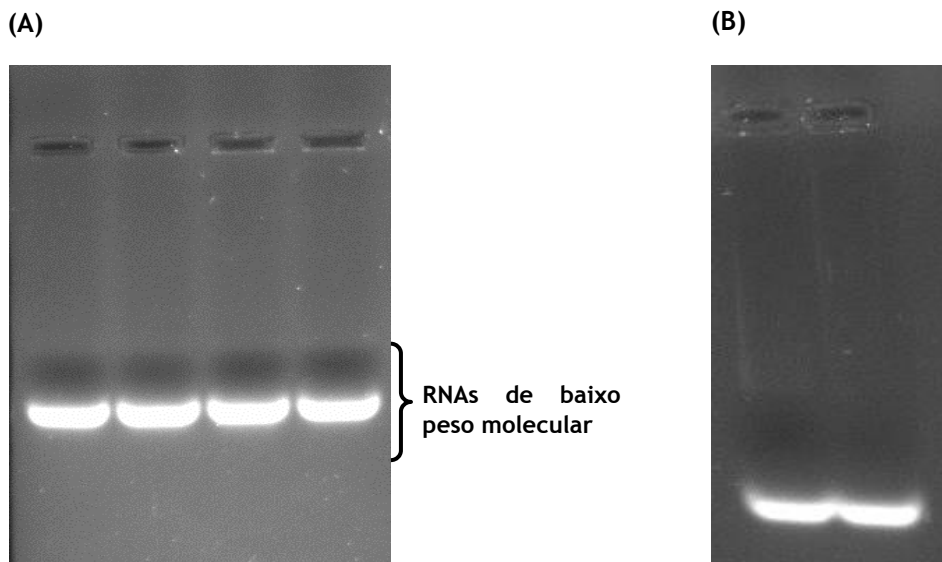


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose, de (A) quatro amostras de RNAs de baixo peso molecular obtidas após extração da bactéria *R. sulfidophilum* e (B) duas amostras de RNAs de baixo peso molecular obtidas após extração da bactéria *E. coli* DH5a.

2. Ensaio Cromatográficos

2.1 Purificação do pre-miR-29b-1 usando a matriz de L-metionina-agarose

Os ensaios cromatográficos realizados com a matriz de L-metionina-agarose tiveram como objetivo a separação do pre-miR-29b-1 dos outros tipos de RNA (RNA 6S e outros pequenos RNAs, incluindo RNAs de transferência) presentes na amostra, recorrendo à cromatografia de afinidade com aminoácidos imobilizados.

Este método cromatográfico utiliza um agente de ligação específico imobilizado na matriz cromatográfica, por forma a reconhecer biomoléculas com base na sua função biológica ou estrutura química [40,71].

A interação entre a matriz de L-metionina e os ácidos nucleicos foi confirmada num estudo recente que descreve a purificação da conformação superenrolada (sc) de pDNA, usando esta matriz [72]. Alguns estudos preliminares foram também realizados no âmbito da purificação de RNA, tendo sido explorado o efeito da manipulação da temperatura, do pH da fase móvel e da concentração de sal, na retenção do RNA. Assim, foi possível comprovar que a L-metionina pode interagir também com o RNA.

As interações que se estabelecem entre o RNA e o ligando de L-metionina podem envolver maioritariamente interações hidrofóbicas, pela presença do grupo tioéter presente no aminoácido de metionina (figura 13), porém outras interações, nomeadamente interações tiofílicas com os polinucleótidos podem também ser consideradas [72].

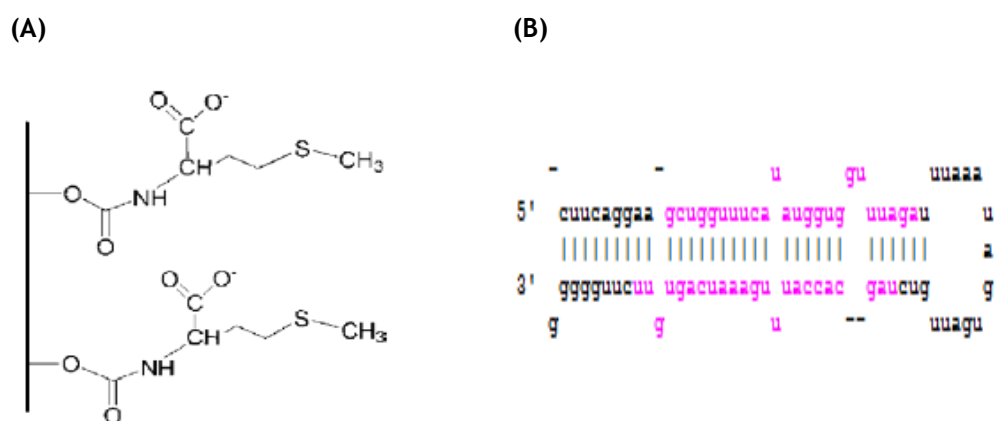


Figura 13 - (A) Estrutura da L-metionina-agarose imobilizada no suporte (adaptado de [73]) e (B) estrutura do pre-miR-29b-1 (consultado em mirbase).

Considerando que as principais interações que ocorrem entre os RNAs e a matriz são de carácter hidrofóbico, foi utilizada uma concentração de sulfato de amónio elevada nos

ensaios cromatográficos, de forma a favorecer as interações hidrofóbicas com as moléculas de RNA. Neste caso, o tampão tem a capacidade para captar as moléculas de água existentes em torno das biomoléculas, fazendo com que os seus grupos hidrofóbicos fiquem mais expostos, favorecendo assim a interação com o ligando.

Tendo em os conta ensaios realizados previamente com a coluna de L-metionina, era já conhecido que uma concentração de 2 M de sulfato de amónio permitia a retenção do RNA. Assim, foi realizado um primeiro ensaio com a coluna, aplicando um gradiente de três passos para a separação dos RNAs de baixo peso molecular, 6S e do pre-miR-29b-1. O gradiente consistiu na aplicação de uma concentração de 1,7 M de sulfato de amónio no primeiro passo, 1,3 M no segundo passo e 0 M de sulfato de amónio em Tris-HCl 10 mM (pH 6,0) no último passo. O ensaio foi realizado à temperatura ambiente (aproximadamente 27°C), usando um caudal de 1 mL/min. Antes da injeção da amostra na coluna, foi feito o acerto da força iónica para a concentração de sal usada na fase de equilíbrio. Na figura 14 é apresentado o cromatograma resultante do ensaio de purificação de RNA usando as condições descritas, e a respetiva eletroforese em gel de poliacrilamida que permite a análise das frações recolhidas do ensaio cromatográfico.

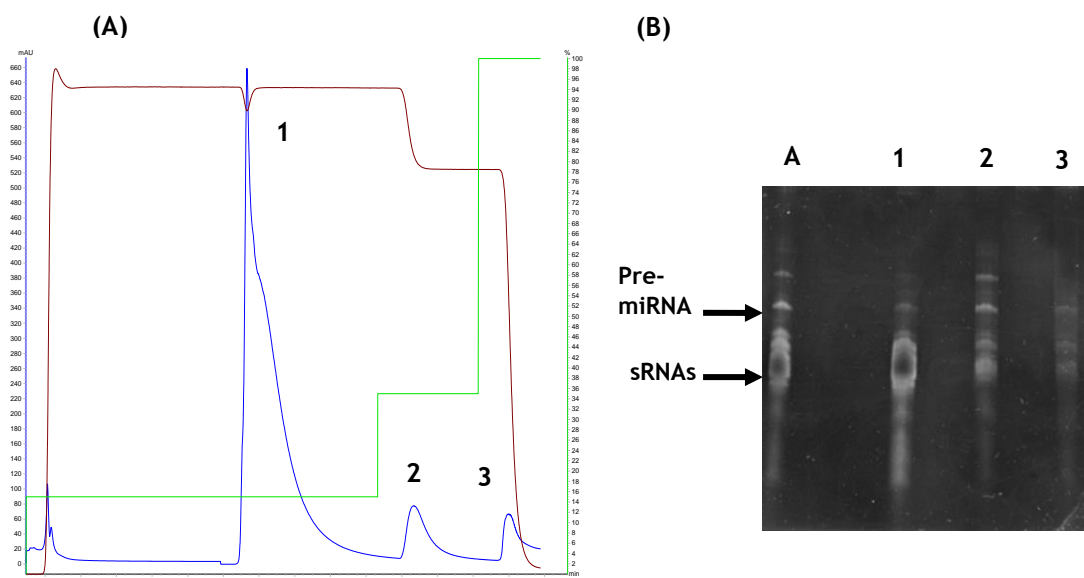


Figura 14 - (A) Perfil cromatográfico obtido com a coluna de L-metionina-agarose, para purificação do pre-miR-29b-1, utilizando um gradiente por passos de 1,7 M; 1,3 M e 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Caudal: 1mL/min; volume de injeção: 100 μL e deteção: 260 nm. **(B)** Análise eletroforética em gel de poliacrilamida dos respetivos picos recolhidos segundo o cromatograma obtido, sendo a linha A: amostra inicial de RNA injetada.

Ao observar o perfil cromatográfico e a respetiva eletroforese do ensaio, foi possível perceber que a concentração de sal usada no primeiro passo permitiu a eluição da maior parte dos sRNAs presentes na amostra, apesar de se observar também uma ligeira perda de pre-miR-29 no primeiro pico (como se comprova pela linha 1 da eletroforese). Seguidamente foram aplicadas duas condições de eluição com concentrações de sal mais baixas para promover alguma seletividade entre os RNAs que ficaram ligados. Embora o pre-miR-29 elua

maioritariamente no segundo pico (linha 2 da eletroforese), é possível observar que ainda persiste alguma contaminação associada à presença de outros sRNAs. No último pico (linha 3 da eletroforese) elui ainda algum pre-miR-29, o que demonstra que a concentração de sal usada no segundo patamar não foi suficiente para a sua eluição completa.

Tendo em conta este resultado, nos ensaios posteriores foram testadas outras condições, nomeadamente usando concentrações de sal diferentes no primeiro patamar do gradiente (1,8 M) para tentar eluir apenas os sRNAs neste passo e manter retido o pre-miR-29. Quanto ao segundo patamar do gradiente, foi necessário diminuir ligeiramente a concentração de sal por forma a tentar recuperar a maior parte do pre-miR-29, tendo-se testado 1,2 M; 1,1 M e 1,0 M, evitando as perdas observadas no primeiro ensaio. Apesar destas tentativas, não foi possível a obtenção de uma separação eficiente dos vários tipos de RNAs presentes na amostra. Isto pode ter ocorrido devido à temperatura da realização dos ensaios (temperatura ambiente), já que a matriz de L-metionina provou ser eficaz na separação das isoformas do pDNA à temperatura de 5°C [72].

Para dar continuidade ao trabalho proposto, e uma vez que não foi possível estabelecer uma nova metodologia de purificação para obter o pre-miR-29b com um grau de pureza adequado, os ensaios de estabilidade foram realizados com recurso a amostra de RNAt extraído a partir de *E. coli* DH5a.

3. Dicroísmo Circular

3.1 Ensaios de estabilidade da molécula de RNA

Como já mencionado anteriormente, muitas biomoléculas são estruturalmente instáveis em solução e suscetíveis a mudanças de conformação devido, a várias tensões desencadeadas durante o seu processamento, etapa de purificação e armazenamento [49].

A espectroscopia de DC apresenta como princípio básico a capacidade em detetar alterações na conformação das biomoléculas, assim como discriminar as suas estruturas, permitindo o estudo da estrutura das biomoléculas em solução [60,74].

A técnica de DC permite assim avaliar o efeito dos diferentes aditivos em estudo (sais, aminoácidos e açúcares) e das condições de armazenamento, na estabilidade do RNA. Tendo em conta, que a molécula de RNA é bastante instável, o primeiro ensaio realizado foi para avaliar a sua estrutura após a etapa de extração, sem qualquer aditivo, de forma a obter o espectro padrão (figura 15) para posterior comparação com os restantes espectros obtidos sob ação dos diferentes aditivos. O espectro padrão da molécula de RNA apresenta as bandas características a 215 nm (banda negativa) e a 265 nm (banda positiva).

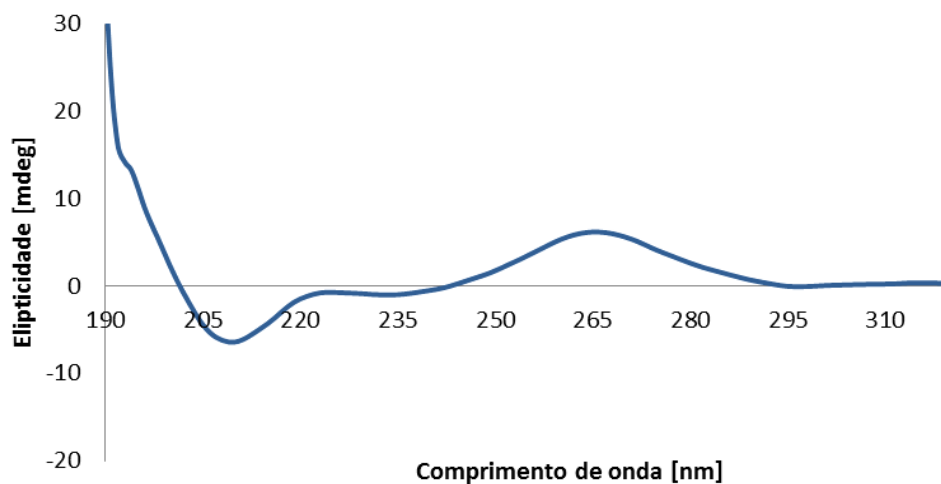


Figura 15 - Espectro padrão do RNA obtido após a etapa de extração, sem inclusão de aditivos. RNA em solução de Tris-HCl em água DEPC (pH 8,0).

No presente estudo, foram efetuados ensaios de estabilidade da molécula de RNA, sob diferentes condições, nomeadamente diferentes classes de aditivos (sais, aminoácidos e açúcares), diferentes temperaturas de armazenamento (4°C, -20°C e -80°C) e diferentes tempos de armazenamento (7, 15 e 30 dias). Apesar de os ensaios serem realizados com RNA total extraído de *E. coli* DH5a, o objetivo será avaliar posteriormente as melhores condições de cada agente aditivo na estabilização do pre-miR-29 para verificar a aplicabilidade das condições a outros RNAs e confirmar a sua atividade biológica.

3.1.1 Sais

Atualmente, uma grande variedade de excipientes, descritos como potenciais estabilizadores de biomoléculas, são utilizados para melhorar/aumentar a sua estabilidade [49]. Porém, como citado anteriormente, os sais podem afetar quer a integridade conformacional quer a estabilidade das biomoléculas, dependendo da concentração e do tipo de sal [58].

Assim, para avaliar a estabilidade estrutural da molécula de RNA, foram selecionados três sais, nomeadamente o EDTA, o citrato de sódio e o acetato de sódio. De maneira, a realizar uma análise mais completa da influência dos diferentes sais na estabilidade da molécula, foram testadas três concentrações diferentes (1 mM, 25 mM e 100 mM). A avaliação das diferentes concentrações de sal permite também determinar qual a concentração mais adequada para promover a estabilização do RNA, durante longos períodos de armazenamento. Para tal, o primeiro estudo realizado foi no sentido de avaliar as alterações estruturais que a molécula de RNA pode sofrer em solução, sob as diferentes concentrações de sais, no dia 0 (após etapa de extração). Os espectros obtidos para cada um dos sais e a sobreposição das diferentes concentrações de sal, no estudo relativo ao dia 0, estão representados na figura 16.

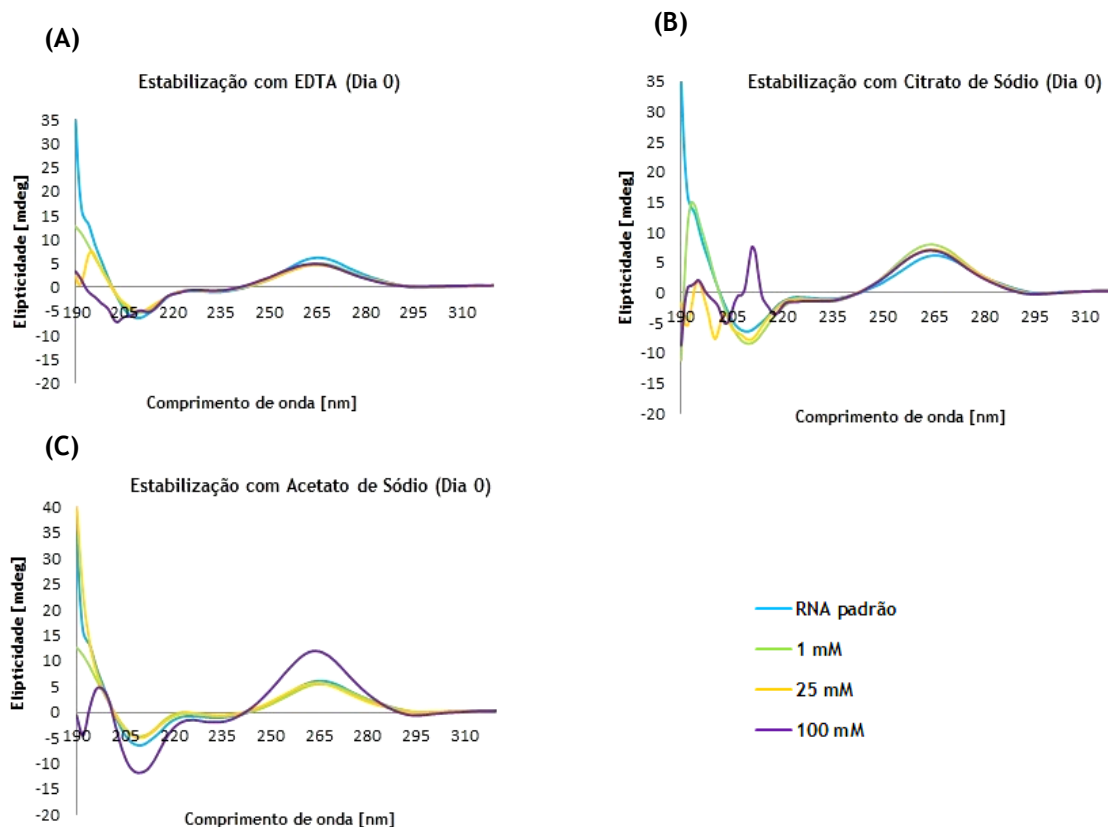


Figura 16 - Espectros de DC da estrutura do RNA em solução sob diferentes concentrações de sal (1 mM, 25 mM e 100 mM, no dia 0. **(A)** Espectros relativos ao EDTA; **(B)** Espectros relativos ao Citrato de sódio; **(C)** Espectros relativos ao Acetato de sódio.

Ao analisar os espectros referentes aos ensaios realizados no dia 0 e comparando com o espectro padrão, é possível perceber que na presença de concentrações de sal mais elevadas (100 mM) existe uma destabilização relativa da banda negativa (215 nm) do RNA. Tendo em conta, que o RNA é um polímero altamente carregado negativamente, esta destabilização pode ocorrer devido a interações iônicas complexas, entre o RNA e o sal [56,75]. Estas interações podem ser de carácter específico ou não específico, promovendo assim a repulsão entre cargas [55].

No entanto, de uma maneira geral, a banda positiva (265 nm) mantém-se estável alterando apenas de forma mais acentuada a sua intensidade na presença de acetato de sódio a 100 mM (figura 16c). Assim, os resultados sugerem que as concentrações de sal 1 mM e 25 mM parecem possibilitar a manutenção da estabilidade do RNA, quando feita a análise comparativamente com o espectro padrão.

Pela análise dos resultados anteriores, verificou-se que a banda negativa do espectro de DC do RNA era mais sensível à presença dos sais, e por isso permite a verificação do efeito dos agentes na estrutura do RNA. Assim, o estudo de estabilidade ao longo do tempo (7, 15 e 30 dias) e para várias temperaturas de armazenamento (4°C, -20°C e -80°C) é apresentado com base na avaliação da banda negativa do espectro, com elipticidade a 215 nm, usando as

concentrações de 1 mM e 25 mM de sais, por serem as que induziam maior estabilização do RNA. A avaliação correspondente à concentração de 1 mM está representada na figura 17.

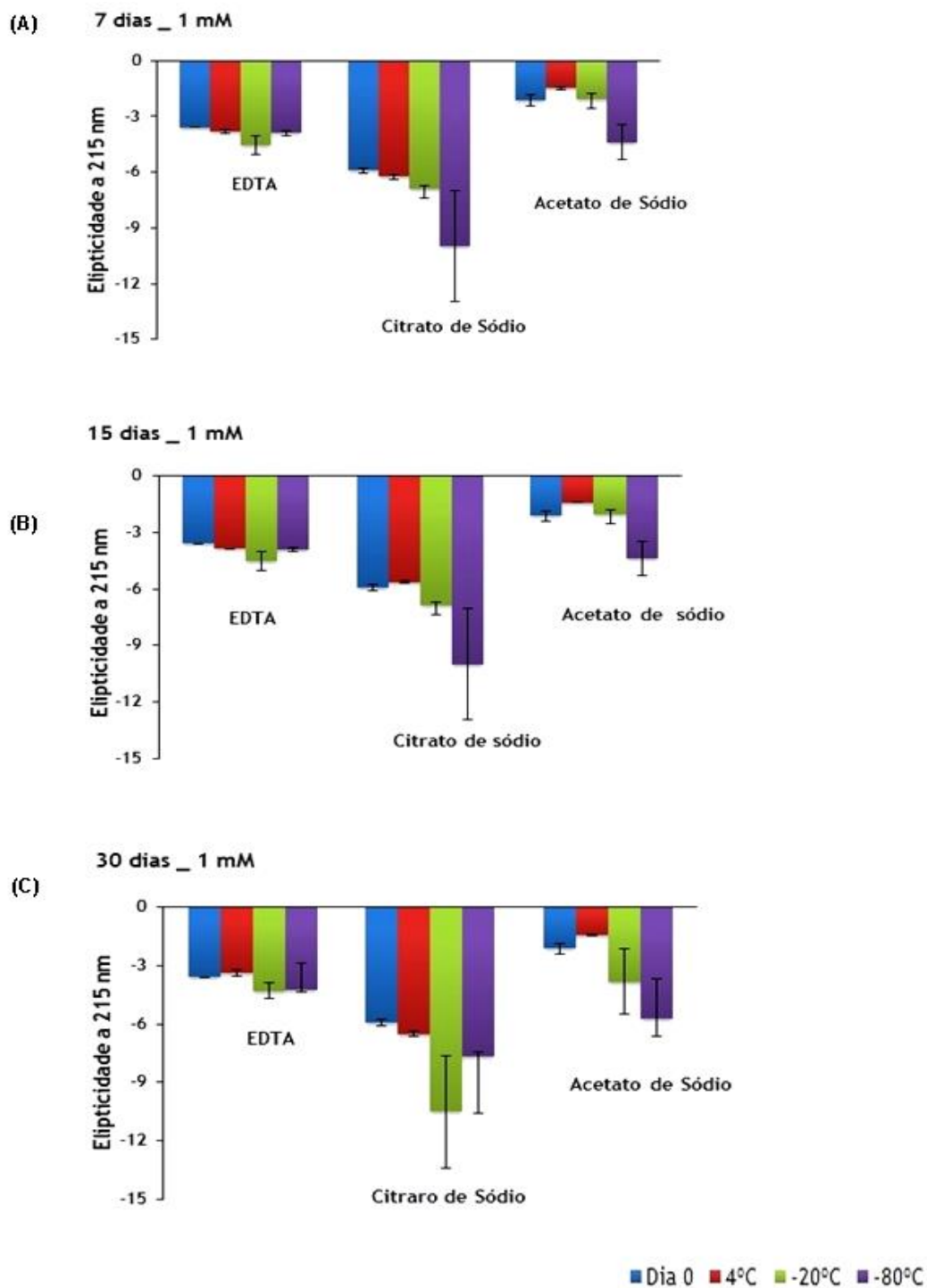


Figura 17 - Elipticidade a 215 nm obtida a partir dos espectros de RNA em solução com 1 mM dos diferentes sais, após armazenamento a 4°C, -20°C e a -80°C, durante 7, 15 e 30 dias. Tendo sido o dia 0 realizado à temperatura ambiente.

Pela análise dos gráficos de barras é possível visualizar que ao longo do tempo de armazenamento do RNA, a diferentes temperaturas, o sal que apresenta um melhor poder de estabilização é o EDTA. Todavia o citrato de sódio mostrou maior instabilidade principalmente quando armazenado a -20 e -80°C. Como o EDTA apresenta resultados satisfatórios na estabilização do RNA, foi feita a sobreposição dos espectros obtidos com este sal, para a concentração de 1 mM, após 30 dias de armazenamento, nas três temperaturas. Estes espectros assim como a respetiva eletroforese em gel de poliacrilamida estão representados na figura 18.

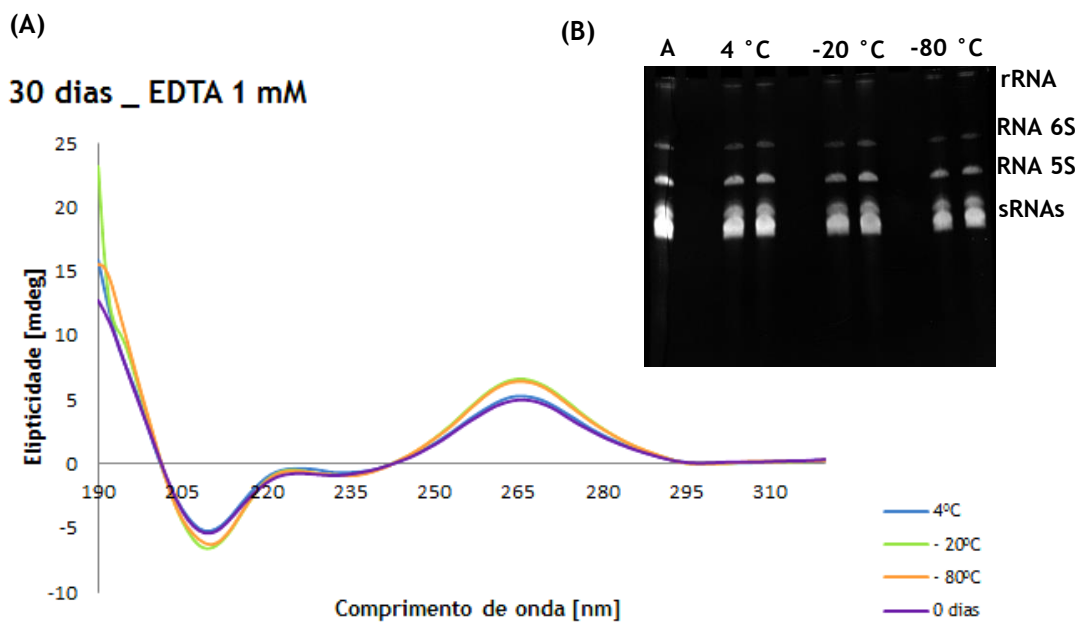


Figura 18 - (A) Sobreposição dos espectros de DC resultantes da análise do RNA em solução de 1 mM de EDTA, após armazenamento durante 30 dias, sob várias condições de temperatura (4, -20 e -80°C). **(B)** Análise eletroforética em gel de poliacrilamida das amostras de EDTA + RNA em diferentes temperaturas ao fim de 30 dias, sendo a linha A: amostra inicial de RNA à temperatura ambiente.

Este resultado sugere que o EDTA é um aditivo que desempenha a função de estabilização da molécula de RNA. Isto poderá dever-se ao facto de o EDTA ser considerado um sal e igualmente um agente quelante de metais, tendo assim a capacidade de proteger a molécula da oxidação [58].

Um estudo semelhante foi realizado para avaliação do efeito da concentração de 25 mM de EDTA, na estabilização do RNA, ao longo do tempo e para as várias temperaturas de armazenamento. Mais uma vez, este estudo baseou-se nas alterações verificadas na elipticidade da banda negativa do RNA, tal como representado na figura 19.

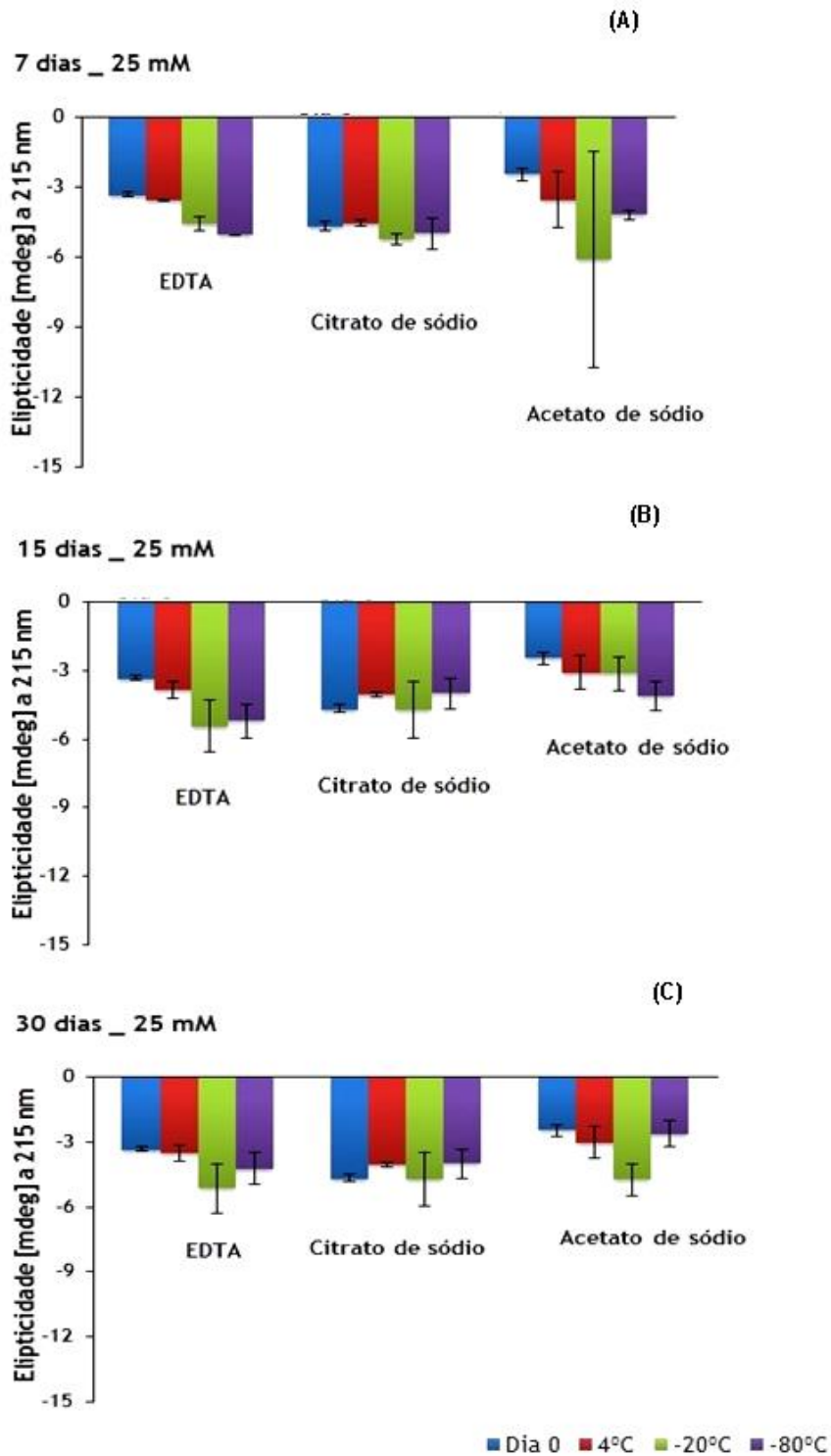


Figura 19 - Elípticidade a 215 nm obtida a partir dos espectros de RNA em solução com 25 mM dos diferentes sais, após armazenamento a 4°C, -20°C e a -80°C, durante 7, 15 e 30 dias. Tendo sido o dia 0 realizado à temperatura ambiente.

Pela análise do gráfico, e ao contrário do esperado para o armazenamento à temperatura de 4°C, é observada uma maior estabilidade ao longo dos 30 dias, para esta temperatura do que para temperaturas mais baixas. Este resultado pode comprovar que, em condições de incubação com temperaturas negativas, pode existir a formação de cristais, levando à perda do “estabilizador” e conseqüentemente levar à destabilização do RNA [49]. Assim, para uma

análise mais completa deste resultado foi feita a sobreposição do espectro de acetato de sódio para a concentração de 25 mM, à temperatura de armazenamento de 4°C, aos 30 dias de incubação com o espectro padrão (figura 20).

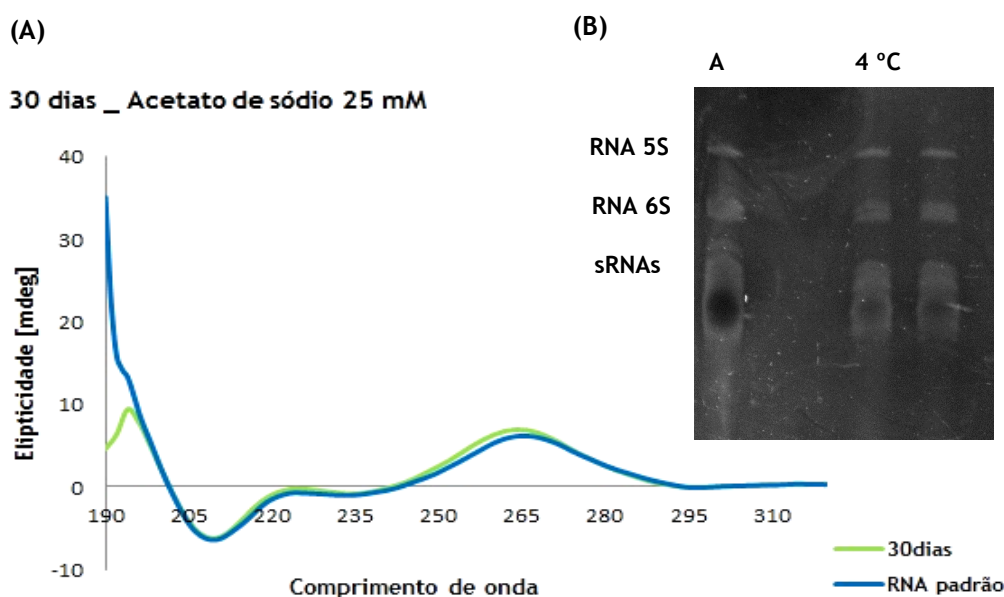


Figura 20 - (A) Análise do espectro de DC da estrutura do RNA em solução de 25 mM de acetato de sódio, após 30 dias de armazenamento, à temperatura de 4°C, em sobreposição ao espectro padrão **(B)** Análise eletroforética em gel de poliácridamida das amostras de Acetato de sódio + RNA à temperatura de 4°C ao fim de 30 dias, sendo a linha A: amostra inicial de RNA à temperatura ambiente.

Ao observar o espectro é possível verificar que o acetato de sódio na concentração de 25 mM mostra ser um bom aditivo para o armazenamento do RNA à temperatura de 4°C, pois as bandas características do RNA não apresentam diferenças de elipticidade significativas quando comparadas com o espectro padrão, mesmo após um armazenamento de 30 dias.

No entanto, fazendo uma análise global dos resultados obtidos para as várias condições testadas, o sal que apresenta melhores condições para a estabilização do RNA é o EDTA, uma vez que apresenta resultados satisfatórios ao longo dos 30 dias nas diferentes temperaturas para a mesma concentração.

3.1.2 Aminoácidos

No estudo do efeito de estabilização do RNA por parte dos aminoácidos, foram testados como aditivos a histidina, a prolina e a arginina, em três concentrações diferentes 1 mM, 25 mM e 100 mM, sendo usadas as mesmas condições de temperatura e tempo de armazenamento que anteriormente foram descritas para o estudo dos sais.

O primeiro ensaio realizado com os aminoácidos foi no dia 0, logo após extração do RNA de *E. coli* e incubação durante 15 min em cada uma das soluções de aminoácidos. Para uma análise das diferenças de elipticidade das bandas de RNA, foram feitas as sobreposições dos espectros

obtidos após incubação com os diferentes aminoácidos em comparação com o espectro padrão (figura 21).

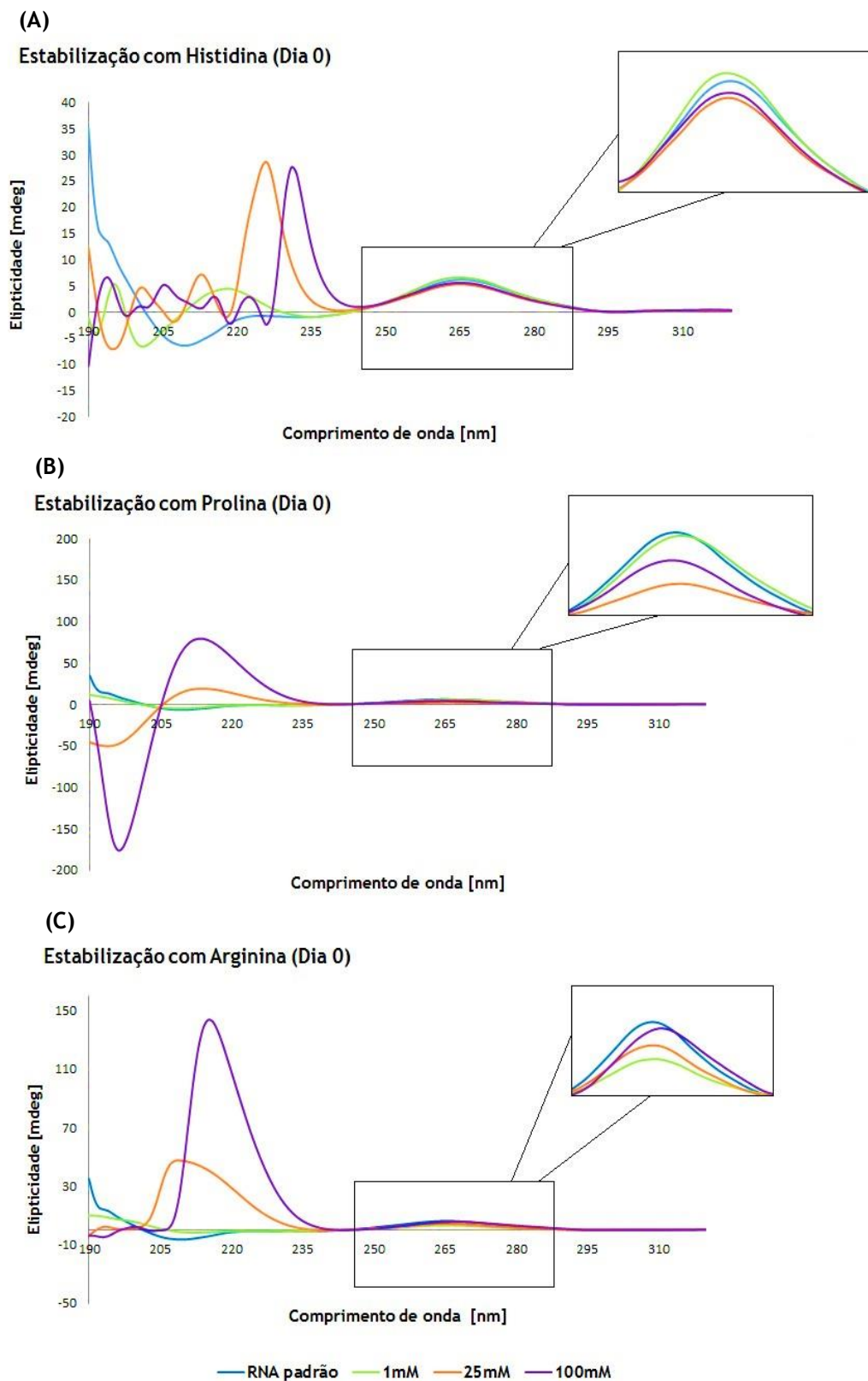


Figura 21 - Espectros de DC do RNA em solução com diferentes aminoácidos, em diferentes concentrações, no dia 0. Espectros de (A) histidina; (B) prolina e (C) arginina.

Analisando os resultados da figura 21 é possível comprovar que para as concentrações mais elevadas dos aminoácidos (25 mM e 100 mM) existe um aumento muito significativo do valor da elipticidade da banda perto dos 215 nm, que no espectro padrão do RNA, se deveria apresentar como banda negativa. No entanto é possível verificar que para a concentração de 1 mM, à exceção da histidina, os aminoácidos demonstram manter um perfil similar ao do espectro padrão. A alteração significativa do espectro para as concentrações mais elevadas dos aminoácidos, pode ser devido à interação existente entre os aminoácidos e o RNA dando origem a um complexo, que apresenta um espectro de DC diferente. Todavia, e por forma a averiguar se o tampão pode influenciar a elipticidade, foram realizados ensaios de todos os tampões dos aminoácidos. Na figura 22 está representado, como exemplo, o espectro referente à solução de arginina.

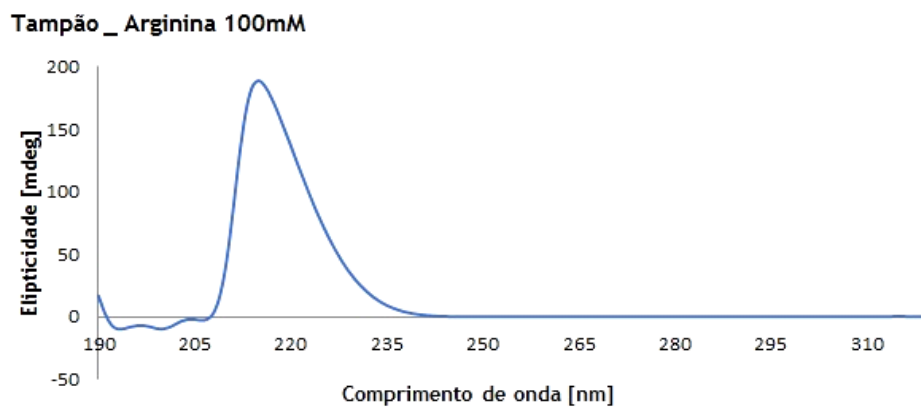


Figura 22 - Espectro de DC obtido na análise do tampão de arginina 100 mM, sem RNA.

De facto, pela análise do resultado anterior é possível observar que a arginina apresenta sinais significativos entre os 205 e 235 nm, que se relacionam com as bandas encontradas nos espectros de RNA em solução de aminoácido. Este perfil de elipticidade verificou-se para os três aminoácidos em todas as concentrações.

Uma vez que a análise da banda a 215 nm está dificultada pelo efeito do aminoácido na mesma região do UV, a ação de estabilização dos aminoácidos sobre a molécula de RNA foi verificada pela avaliação da banda positiva. Logo, foi feito o estudo da estabilidade analisando a banda a 265 nm ao longo dos 30 dias de armazenamento, em diferentes condições quer de temperatura (4°C, -20°C e -80°C) quer de concentração de aminoácidos. Para uma abordagem mais linear desta comparação de estabilidade da banda positiva, foi feita sempre em comparação com o valor de elipticidade de cada aminoácido ao dia 0 para cada uma das concentrações usadas. A tabela 10 apresenta os valores de elipticidade no dia 0 para a concentração de 1 mM dos diferentes aminoácidos, por forma a comparar a elipticidade obtida ao longo do tempo (figura 23).

Tabela 10 - Valor de elipticidade a 265 nm no dia 0 para os diferentes aminoácidos, na concentração de 1 mM com RNA.

Aminoácidos	Elipticidade [mdeg] a 265nm
Histidina	6,59
Prolina	5,88
Arginina	3,09

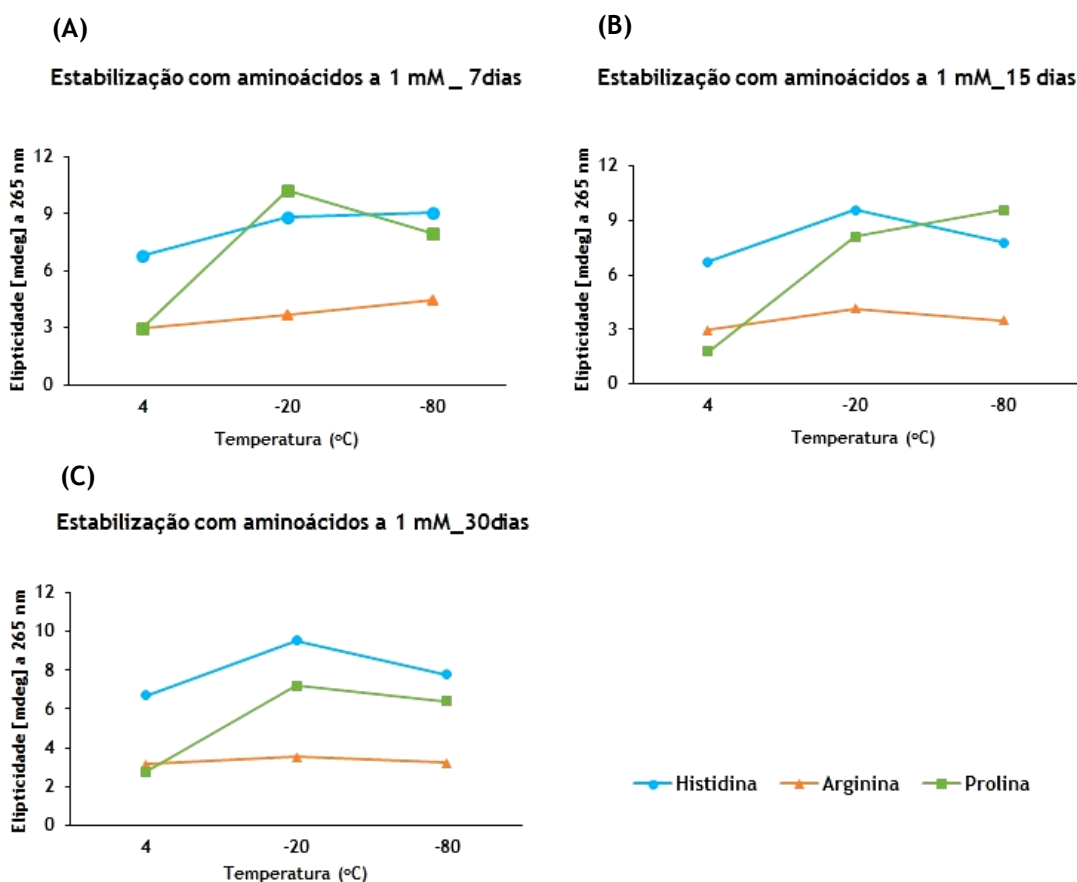


Figura 23 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 265 nm, na presença de 1 mM dos diferentes aminoácidos, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: (A) 7 dias, (B) 15 dias e (C) 30 dias.

Pela análise dos resultados é possível verificar que para a concentração de 1 mM a arginina comparativamente com os outros aminoácidos é o que apresenta valores de elipticidade relativamente constantes ao longo do tempo (até 30 dias de armazenamento) e em diferentes condições de temperatura. O dia 0 foi tido sempre em consideração nesta análise. No entanto, no caso da prolina e da histidina é notória alguma oscilação da banda positiva, para as diferentes condições testadas. Desta forma, fomos de seguida fazer a mesma análise

alterando apenas o valor da concentração usada de aditivo, neste caso para a concentração de 25 mM. A tabela 11 apresenta os valores de elipticidade no dia 0 para a concentração de 25 mM dos diferentes aminoácidos, que permitem fazer a comparação com os resultados da figura 24.

Tabela 11 - Valor de elipticidade a 265 nm no dia 0 para os diferentes aminoácidos, na concentração de 25 mM com RNA.

Aminoácidos	Elipticidade [mdeg] a 265nm
Histidina	5,32
Prolina	2,48
Arginina	4,24

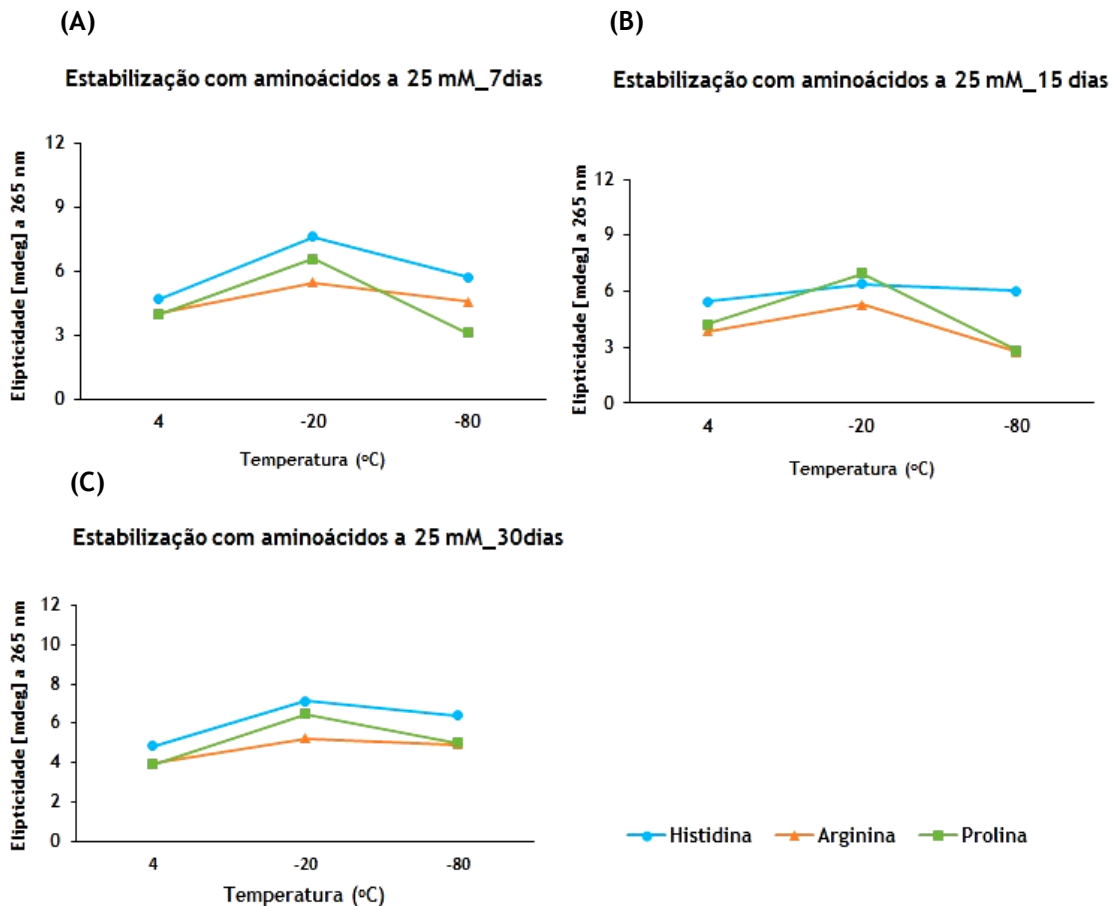


Figura 24 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 265 nm, na presença de 25 Mm dos diferentes aminoácidos, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: (A) 7 dias, (B) 15 dias e (C) 30 dias.

Após análise dos gráficos referentes à elipticidade da banda a positiva, verificou-se que em comparação com o valor do dia 0 a histidina permite manter a banda mais estável ao longo

dos 30 dias de armazenamento, para a temperatura de 4°C. Para a prolina é possível verificar que existe sempre oscilação da elipticidade da banda em relação ao seu valor inicial. A arginina, à semelhança do descrito para 1 mM, parece induzir uma maior estabilização, observando-se apenas uma oscilação após 15 dias de armazenamento à temperatura de -80°C. Com o objetivo de avaliar mais em detalhe o efeito da concentração dos aminoácidos na estabilidade do RNA, foi ainda realizado o mesmo estudo para a concentração de 100 mM, apesar de os espectros iniciais indicarem maior alteração, especialmente para a banda negativa do espectro. Na tabela 12 estão apresentados os valores da elipticidade no dia 0 por forma a comparar com os gráficos da figura 25.

Tabela 12 - Valor de elipticidade a 265 nm no dia 0 para os diferentes aminoácidos, na concentração de 100 mM com RNA.

Aminoácidos	Elipticidade [mdeg] a 265nm
Histidina	5,57
Prolina	4,18
Arginina	5,44

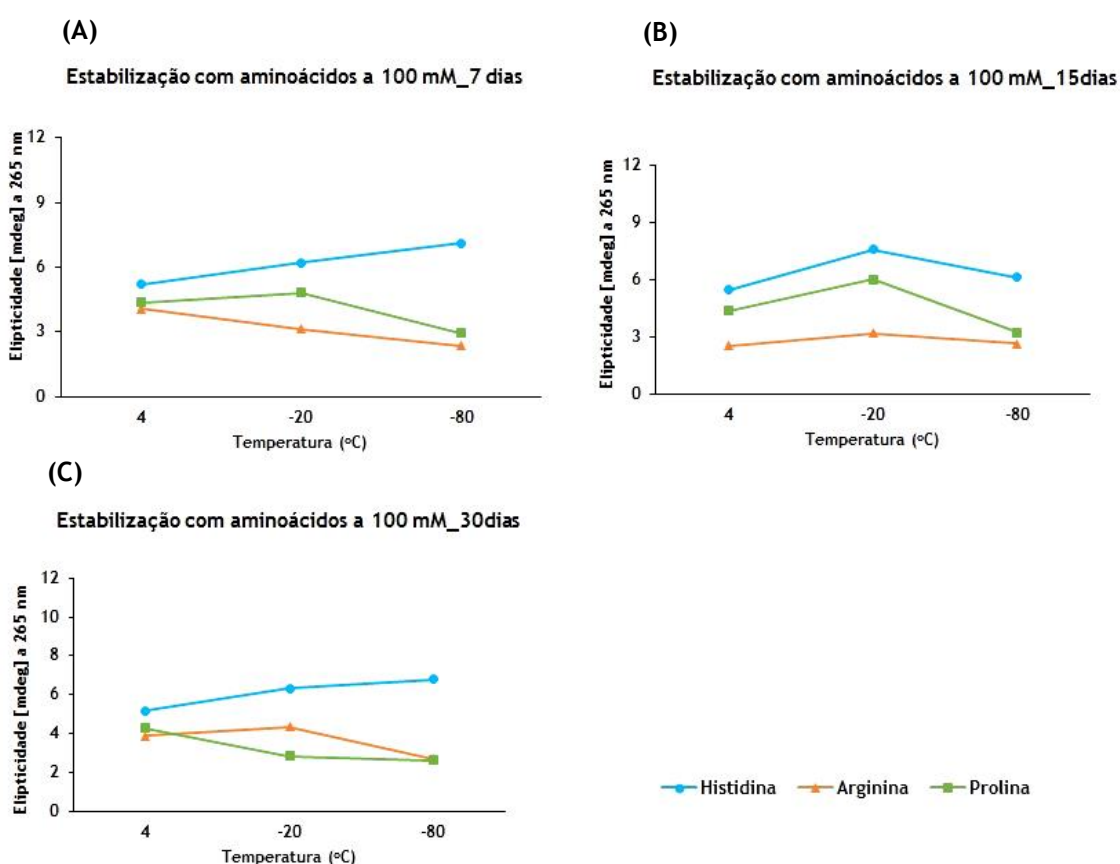


Figura 25 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 265 nm, na presença de 100 mM dos diferentes aminoácidos, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: (A) 7 dias, (B) 15 dias e (C) 30 dias.

Analisando os resultados respetivos à concentração de 100 mM, comprova-se que a histidina consegue manter a estabilidade do RNA ao longo do tempo para o armazenamento à temperatura de 4°C. A prolina, para esta concentração, também apresenta uma elipticidade constante aos 4°C, mesmo após conservação por 30 dias. No entanto, no caso da arginina ao contrário do que se verificou para as concentrações mais baixas, para 100 mM não apresenta bons resultados, sendo observadas alterações na elipticidade da banda, para todas as condições. Em suma, a arginina, pela análise global de todas as condições testadas parece ser o aminoácido que apresenta melhores resultados para promover a estabilidade do RNA ao longo do tempo de conservação nas três temperaturas testadas, usando as concentrações de 1 e 25 mM. Isto pode dever-se ao facto da arginina ter um comportamento exclusivo na presença de diversas biomoléculas, tendo a capacidade de promover efeitos de tensão superficial, hidratação e favorecer diversas interações com as biomoléculas [58]. No entanto, a arginina não é normalmente vista como um excipiente de estabilização de biomoléculas, mas é considerada altamente eficaz na supressão da agregação das biomoléculas [49], o que pode favorecer a sua estabilização e atividade.

3.1.3 Açúcares

Os açúcares são considerados e usados como agentes crioprotetores de diversas biomoléculas e com capacidade de aumentar a tensão superficial em soluções aquosas [55,58].

Para este estudo de estabilidade, os açúcares selecionados foram o sorbitol, a trealose e a sacarose. As condições utilizadas para efetuar este estudo foram as mesmas já descritas para os diferentes aditivos mencionados anteriormente, à exceção das concentrações, que neste caso foram de 295 mM e 590 mM de cada açúcar. Inicialmente, foram realizados os ensaios ao dia 0, com dissolução do RNA nas soluções de açúcares, com as diferentes concentrações, fazendo-se a comparação com o espectro padrão de RNA. De maneira a ter uma melhor observação desses resultados, foi feita a sobreposição dos diferentes espectros tendo em conta o espectro padrão (figura 26).

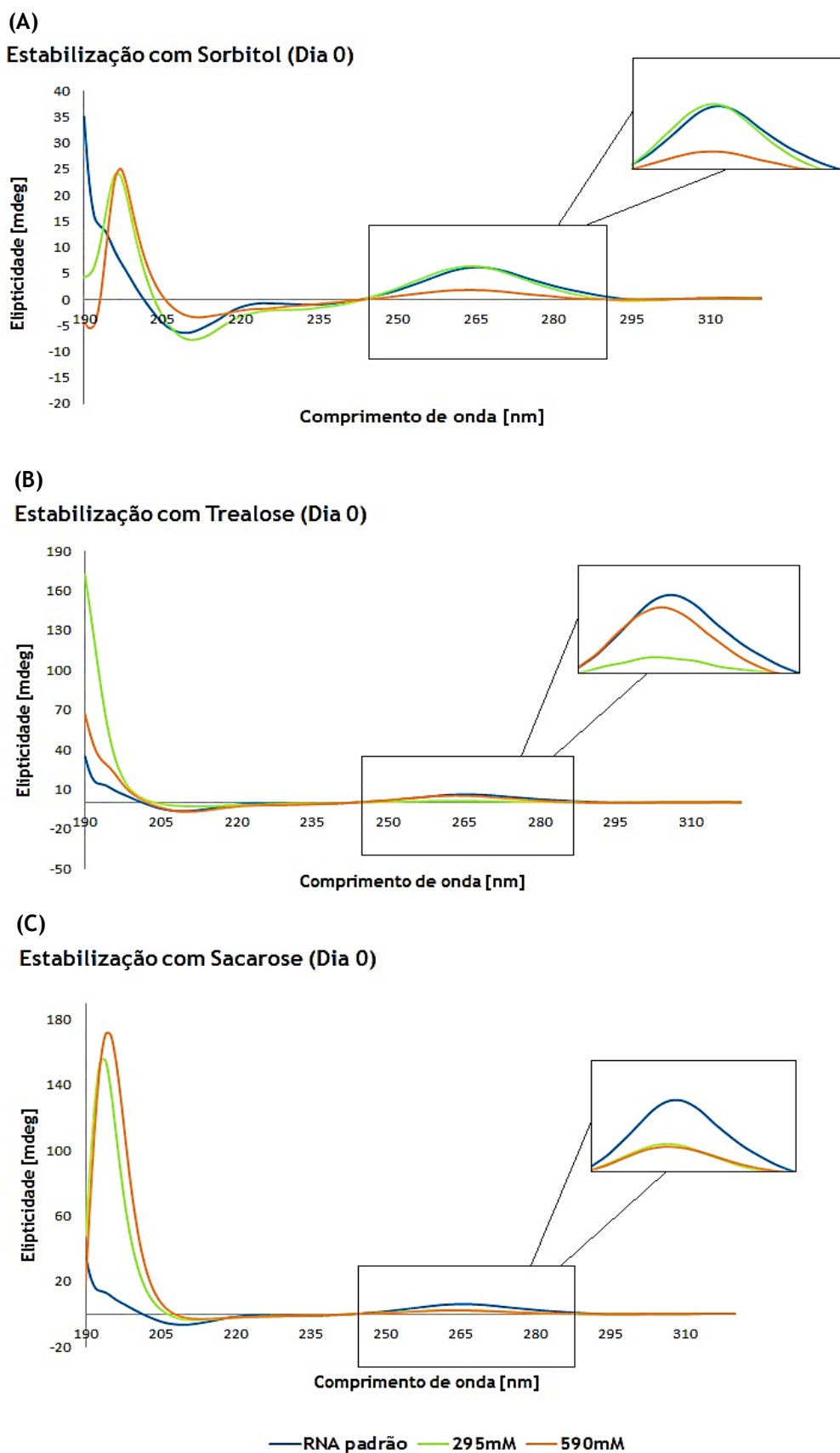


Figura 26 - Espectros de DC do RNA em solução com diferentes açúcares, em diferentes concentrações, no dia 0. Espectros de **(A)** sorbitol; **(B)** sacarose e **(C)** trealose.

Ao analisar os espectros referentes à incubação do RNA com os diferentes açúcares, é possível verificar que tal como acontece nos aminoácidos, a elipticidade na região entre 205 e 220 nm sofre bastantes interferências, provavelmente devido à ação dos açúcares, especialmente nos casos da trealose e sacarose. Pela análise dos resultados, é possível verificar que para a concentração mais alta de sorbitol (590 mM) existe uma diminuição acentuada da elipticidade da banda positiva e também uma alteração significativa na banda negativa (que se aproxima de zero), em comparação com o padrão. No entanto, a concentração mais baixa (295 mM) sugere ser útil na manutenção da estabilidade do RNA, não ocorrendo diferenças significativas na elipticidade das bandas. Quanto à trealose, o melhor resultado foi observado para a concentração mais alta, enquanto a sacarose apresenta desvios em ambas as bandas com as duas concentrações, quando em comparação com o espectro padrão. Para reunir os resultados, a tabela 13 apresenta os valores de elipticidade a 265 nm para o RNA na presença de cada açúcar, na concentração de 295 mM, ao dia 0. A figura 27 permite a análise das alterações verificadas para as condições de armazenamento em estudo (temperatura e tempo de conservação).

Tabela 13 - Valor de elipticidade a 265 nm no dia 0 para os diferentes açúcares, na concentração de 295 mM com RNA.

Açúcares	Elipticidade [mdeg] a 265nm
Sorbitol	6,37
Trealose	1,29
Sacarose	2,41

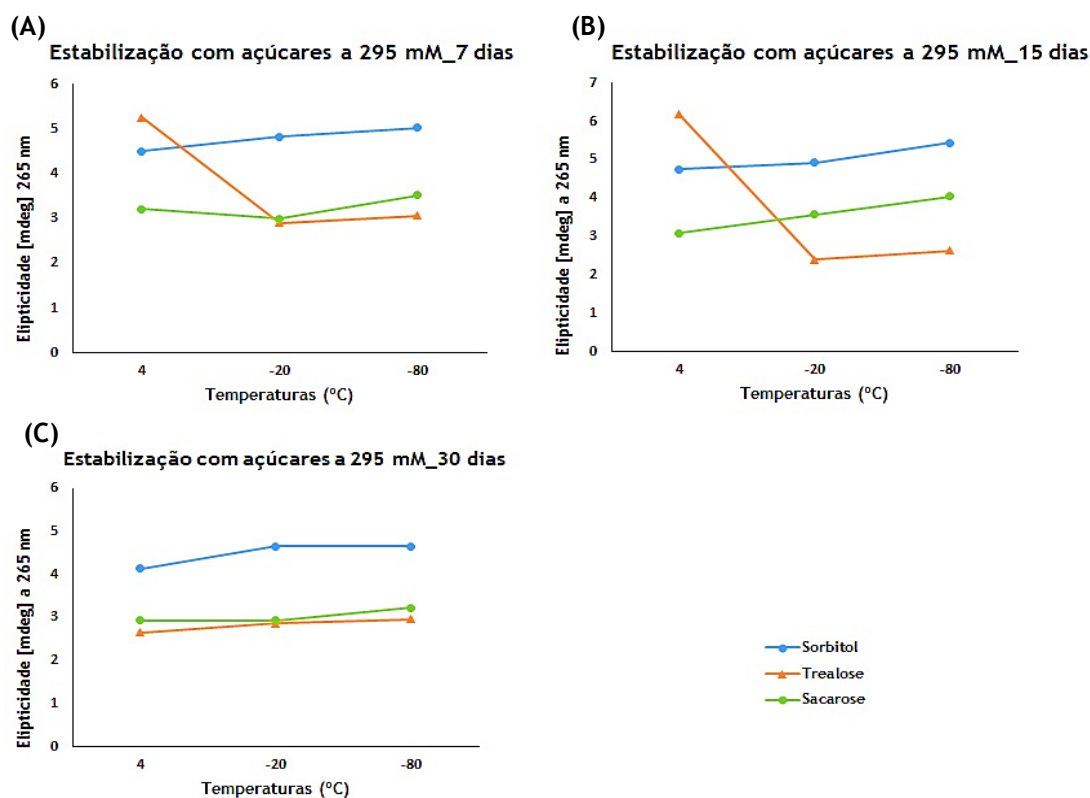


Figura 27 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 265 nm, na presença de 295 mM dos diferentes açúcares, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: **(A)** 7 dias, **(B)** 15 dias e **(C)** 30 dias.

Ao analisar os gráficos referentes à banda positiva do espectro de DC, para a concentração de 295 mM de açúcares, verifica-se que relativamente ao sorbitol e comparativamente com o valor padrão do dia 0, é observada uma diminuição da elipticidade não muito significativa ao longo dos 30 dias para as 3 temperaturas. De notar no entanto uma ligeira diminuição de elipticidade aos 15 dias à temperatura de -20°C. À semelhança do que já foi verificado anteriormente, a trealose não apresenta bons resultados para a concentração testada, apresentando sempre grandes oscilações de elipticidade, não indicando resultados promissores em termos de estabilidade e manutenção da atividade do RNA. Já no caso, da sacarose é possível verificar um ligeiro aumento de elipticidade à temperatura de -80°C, não havendo outras alterações significativas.

Considerando as diferenças encontradas para as duas concentrações de açúcares, a mesma representação foi feita para avaliar os resultados obtidos com a incubação do RNA com os açúcares no concentração mais elevada (590 mM). A tabela 14 apresenta os valores no dia 0, do RNA incubado com os diferentes açúcares.

Tabela 14 - Valor de elipticidade a 265 nm no dia 0 para os diferentes açúcares, na concentração de 590 mM com RNA.

Açúcares	Elipticidade [mdeg] a 265nm
Sorbitol	1,80
Trealose	5,15
Sacarose	2,19

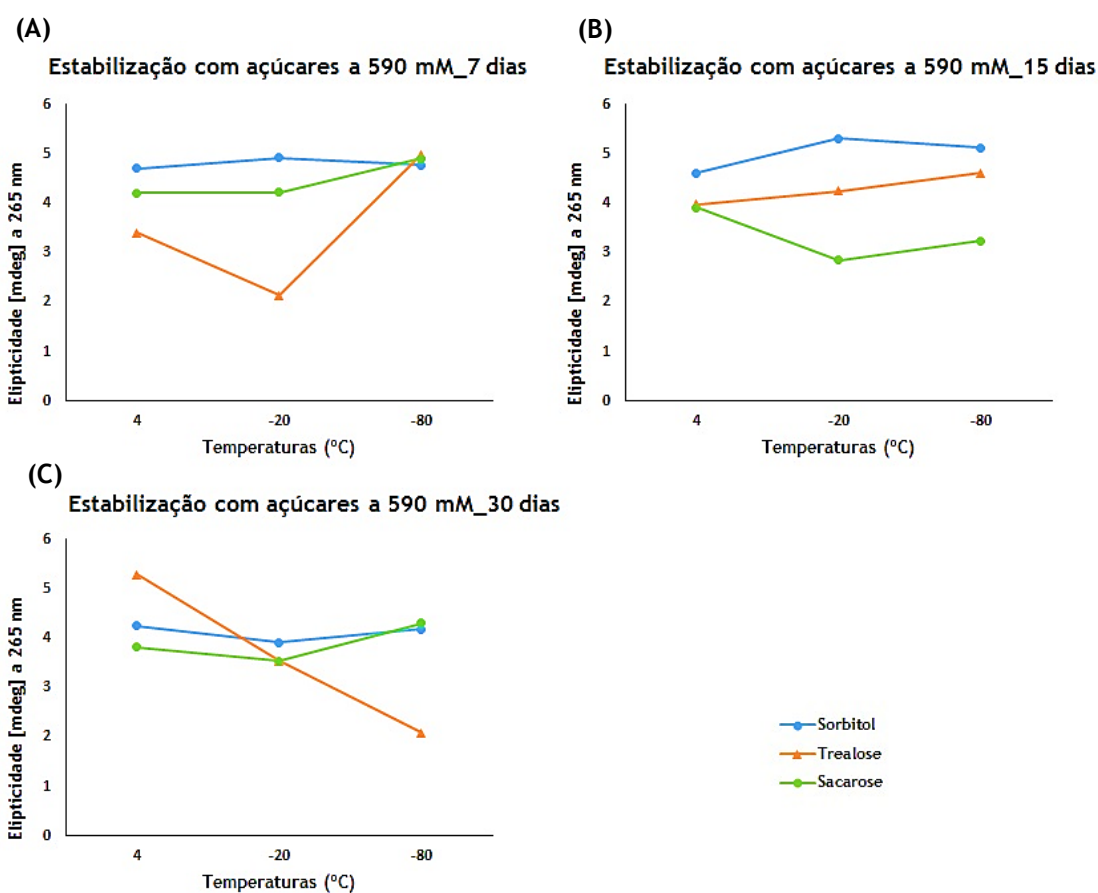


Figura 28 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 265 nm, na presença de 590 mM dos diferentes açúcares, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: (A) 7 dias, (B) 15 dias e (C) 30 dias.

Pela análise dos perfis dos gráficos, é possível perceber que para o sorbitol e para a sacarose a elipticidade da banda positiva (a 265 nm) aumenta significativamente, em comparação com o valor do dia 0. No entanto, o sorbitol permite uma estabilização da banda ao longo dos 15 dias à temperatura de 4 °C, enquanto a sacarose também sob a mesma temperatura consegue estabilizar a estrutura do RNA ao longo de 30 dias. Este resultado sugere que relativamente à estabilidade da banda positiva, o melhor açúcar parece ser o sorbitol com a concentração de 295 mM. Ainda assim, foram realizados os mesmos estudos relativamente à banda negativa,

de forma a perceber a ação dos açúcares sobre esta segunda banda característica do RNA. A tabela 15 apresenta o valor do dia 0 a 215 nm para a concentração de 295 mM.

Tabela 15 - Valor de elipticidade a 215 nm no dia 0 para os diferentes açúcares, na concentração de 295 mM com RNA.

Açúcares	Elipticidade [mdeg] a 215nm
Sorbitol	-6,17
Trealose	-2,55
Sacarose	-3,13

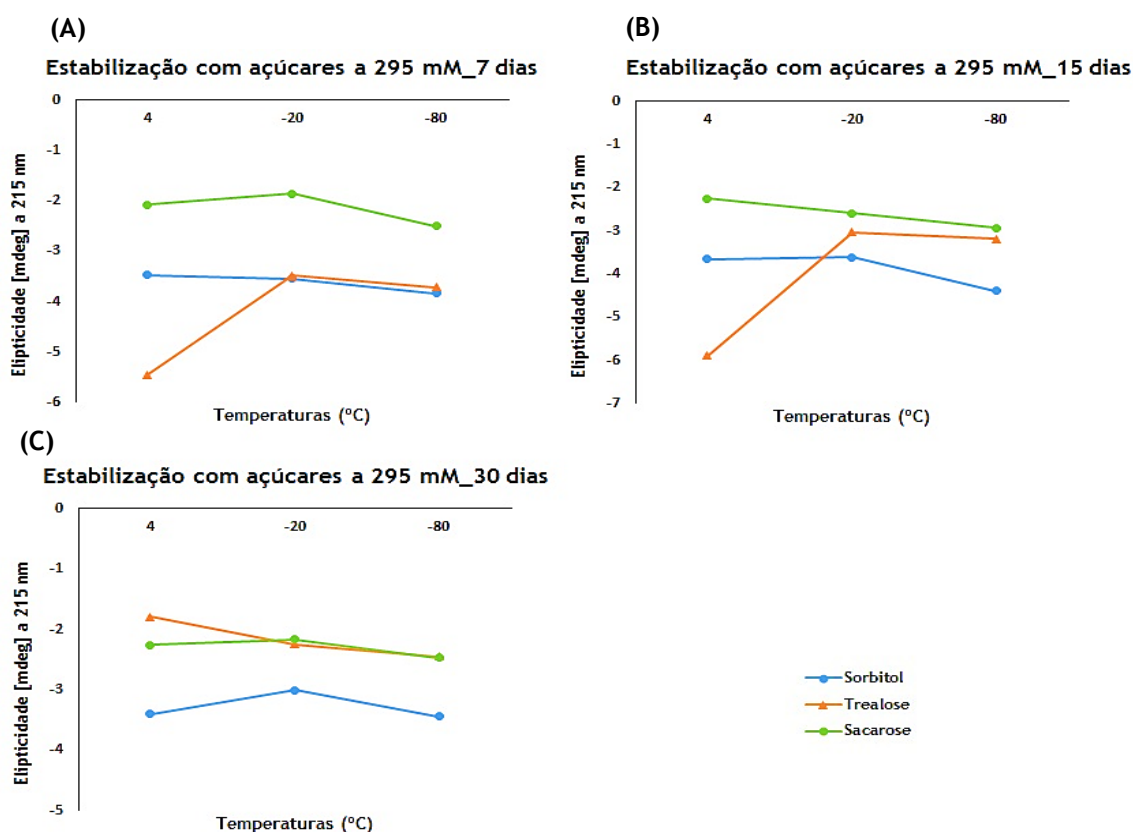


Figura 29 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 215 nm, na presença de 295 mM dos diferentes açúcares, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: (A) 7 dias, (B) 15 dias e (C) 30 dias.

Relativamente às alterações observadas para a banda negativa, verifica-se que para o sorbitol, embora o valor da elipticidade comparada com o padrão tenha um ligeiro aumento (a banda torna-se menos negativa) é notória a estabilidade da banda ao longo dos 30 dias à temperatura de 4°C, o mesmo se verificando para a sacarose. No entanto a trealose mostra

oscilações significativas da elipticidade, à semelhança do que já tinha sido descrito para a banda positiva do RNA.

O mesmo estudo foi feito para a concentração de 590 mM, para concluir a análise do efeito da concentração dos açúcares na estabilidade do RNA. A tabela 16 apresenta os valores de elipticidade para o dia 0 dos diferentes açúcares com incubação do RNA.

Tabela 16 - Valor de elipticidade a 215 nm no dia 0 para os diferentes açúcares, na concentração de 590 mM com RNA.

Açúcares	Elipticidade [mdeg] a 215nm
Sorbitol	-3,07
Trealose	-5,43
Sacarose	-2,75

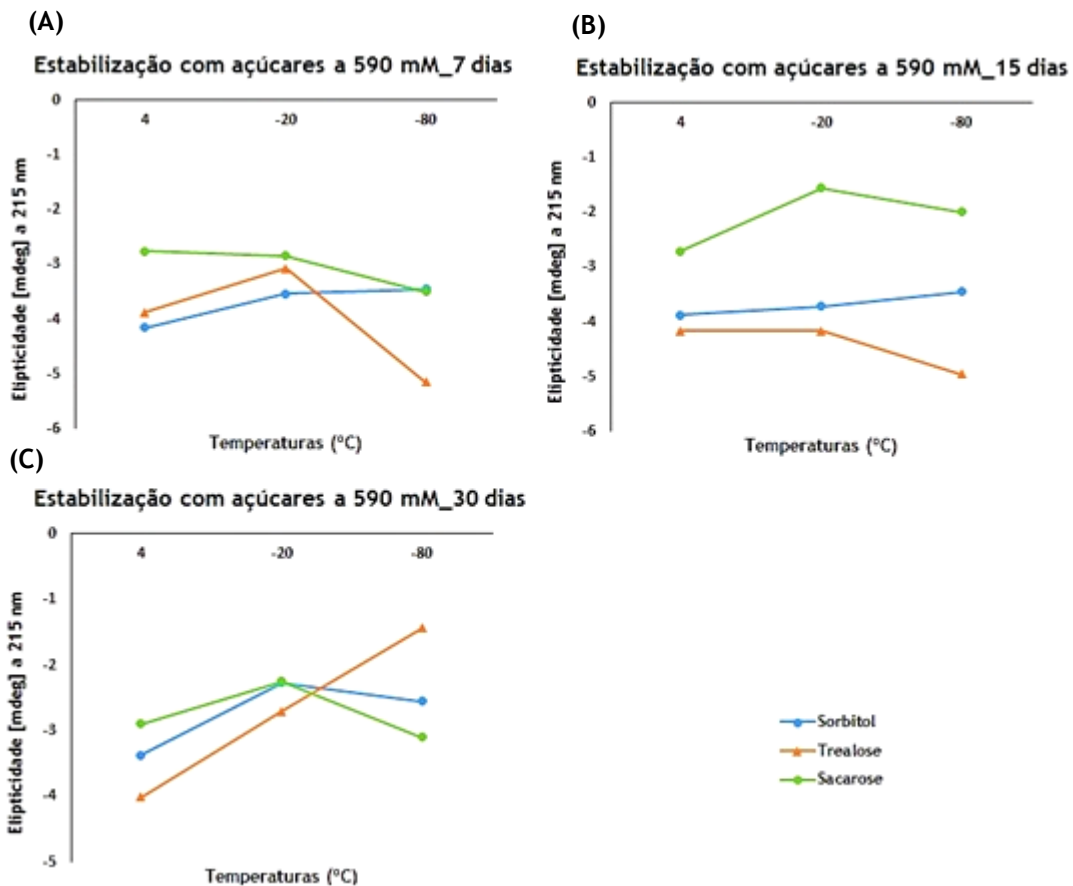


Figura 30 - Representação gráfica da elipticidade do RNA a 215 nm, na presença de 590 mM dos diferentes açúcares, para as três temperaturas de armazenamento, em função do tempo: (A) 7 dias, (B) 15 dias e (C) 30 dias.

Tendo em conta os resultados obtidos para a elipticidade da banda negativa com o aumento da concentração de açúcar, verifica-se que a trealose volta a apresentar grandes variações de elipticidade, indicando que poderá não funcionar como um bom estabilizador para a manutenção da estrutura e atividade do RNA.

Relativamente ao sobitol e à sacarose, não se verificaram alterações tão significativas nesta banda negativa, para a concentração de açúcar mais elevada, o que poderá indicar um melhor efeito de estabilização, em comparação com a concentração mais baixa, que revelou mais alterações no espectro, quer para a banda positiva, quer para a banda negativa.

De uma maneira geral, e surpreendentemente, os melhores resultados em termos de estabilidade do espectro de DC para o RNA, foram obtidos para a temperatura de 4°C, mesmo para o armazenamento por períodos de 30 dias. Isto pode dever-se ao facto de haver formação de cristais aquando do seu armazenamento sob temperaturas negativas, nomeadamente pela ação do sorbitol [58].

Globalmente, este resultado pode ter um impacto positivo quando se perspetiva a utilização do RNA como agente terapêutico, uma vez que será mais vantajosa a sua conservação para 4°C do que para temperaturas negativas. De qualquer forma, os resultados precisam de ser confirmados, avaliando a manutenção da atividade do RNA, nestas condições. Se a atividade também for garantida para as melhores condições aqui testadas, será uma forma de confirmar e validar a utilização destes aditivos e condições para a conservação do RNA.

4. Estudos de transfeção do pre-miR-29b-1

De modo a confirmar a eficiência dos estabilizadores e condições de armazenamento na manutenção da integridade e atividade do RNA, foram realizados alguns ensaios *in vitro*, usando o pre-miR-29 como modelo. Como referido anteriormente, o miR-29 tem ação de silenciamento sobre a BACE 1, e por isso estes ensaios têm como objetivo verificar os níveis de expressão do mRNA da BACE 1, nas células neuronais, após transfeção com o pre-miR-29 recombinante que foi sujeito às melhores condições definidas anteriormente. Nesta abordagem para se conseguir obter a purificação desejada da molécula de pre-miR-29, foi utilizada a estratégia já descrita pelo grupo de investigação, que passa pela utilização da L-arginina-Sepharose [25].

Após efetuada a avaliação das melhores condições (temperatura e tempo de armazenamento e aditivo) o estudo de estabilidade do pre-miR-29 foi realizado com incubação a 4°C e a -80°C em arginina, EDTA e sorbitol durante 30 dias. Os estudos de transfeção em células N2a695 foram realizados para avaliar a atividade biológica do pre-miR-29 e verificar os níveis de expressão do mRNA da hBACE 1. Para este estudo foram usadas células não tratadas por forma a ter um controlo negativo. A figura 31 apresenta os resultados obtidos.

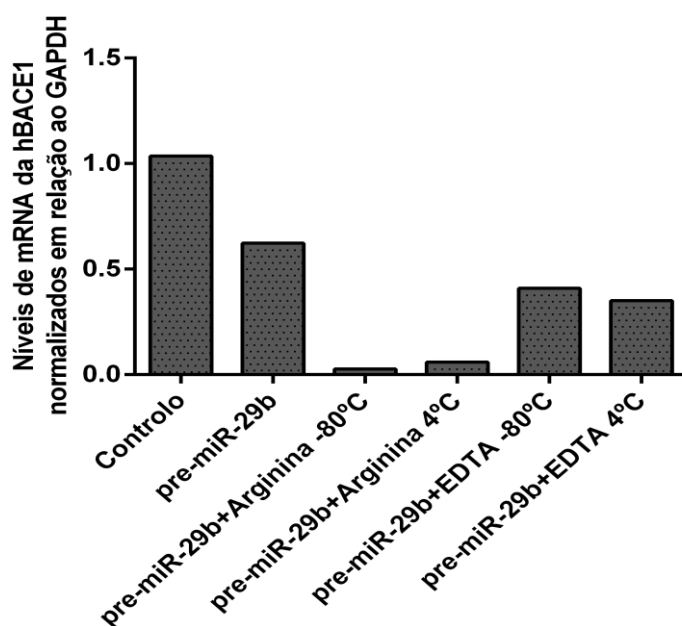


Figura 31 - Níveis de expressão do mRNA da hBACE1 após transfeção com pre-miR-29 sujeito às melhores condições reveladas nos estudos de DC.

Relativamente aos ensaios realizados com sorbitol, não foi possível concluir o efeito sobre a atividade biológica do pre-miR-29, uma vez que as células não permaneceram viáveis após a transfeção. Este resultado pode indicar que a concentração usada de sorbitol pode apresentar alguma toxicidade celular, e por isso ensaios adicionais seriam necessários, para concluir sobre a ação da melhor concentração deste agente. Quanto aos restantes ensaios, e

interpretando os resultados obtidos após a transfeção, é possível perceber que na presença de pre-miR-29 estabilizado com arginina se verifica uma diminuição significativa da expressão do mRNA da proteína hBACE1, quando comparado com as outras condições. Além disso, é também importante realçar este efeito acentuado quer para o armazenamento a -80°C quer para 4°C. Assim, estes resultados conjugados com os resultados obtidos no DC, sugerem que a arginina pode ser um bom agente a adicionar às preparações de pre-miR-29 para manter a sua estrutura e atividade, levando à degradação dos transcritos ou à repressão da tradução da hBACE1 permitindo um potencial controlo da DA.

Em estudos recentes foi demonstrado que a formulação de nanopartículas modificadas com aminoácidos melhora notavelmente a entrada nas células, nomeadamente através da modificação das partículas com arginina. Esta eficiência de transfeção está relacionada com a possibilidade das partículas escaparem ao endossoma, facilitando a entrega do material genético e a sua expressão [76].

Também neste caso, a incubação do RNA com arginina pode de alguma forma ter estabilizado o complexo, facilitando a entrada na célula e induzindo o processamento do pre-miR-29, promovendo a sua ação.

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas Futuras

Nos últimos anos, o estudo em volta da molécula de RNA teve um enorme desenvolvimento/impacto no que diz respeito à sua aplicação a nível terapêutico, já que se reconhece o seu envolvimento em inúmeras doenças, nomeadamente do foro oncológico e neurodegenerativo. Diversos tipos de RNAs têm sido identificados, nomeadamente os ncRNAs, considerados potenciais produtos terapêuticos devido à sua atuação em diversas vias regulatórias, promovendo assim o silenciamento de vários genes. Como já referido anteriormente, a molécula de pre-miR-29b desempenha um papel importante na progressão da doença de Alzheimer. Contudo, a molécula de RNA é bastante frágil e sensível a diversos fatores, que podem promover a sua instabilidade e degradação. Assim, é fundamental manter a sua integridade e estabilidade estrutural ao longo de todo o seu processamento, por forma a garantir a sua atividade biológica.

O presente trabalho teve como objetivo inicial o desenvolvimento de uma nova estratégia de purificação para obter o pre-miR-29b com elevado grau de pureza, a partir de uma matriz de L-metionina-agarose. Foram exploradas várias concentrações de sulfato de amónio, quer nos passos de ligação quer nos passos de eluição, de forma a manipular vários tipos de interações, nomeadamente hidrofóbicas, para isolar o pre-miR-29b dos vários tipos de RNAs presentes na amostra. Porém, os resultados obtidos não revelaram seletividade entre os vários tipos de RNAs. Assim, optou-se por utilizar a estratégia de purificação já delineada pelo grupo de investigação, baseada na utilização da matriz de L-arginina-Sepharose.

Posteriormente foram realizados estudos “preliminares” de dicroísmo circular para avaliar a estabilidade estrutural do RNA total colocando a amostra em contato com diferentes tipos de estabilizadores, com posterior armazenamento sob diferentes condições (temperatura e tempo de armazenamento). Pela análise dos espectros de DC, é possível concluir que após incubação com EDTA durante 30 dias a -80°C numa concentração de 1 mM, a estabilidade da molécula de RNA mantém-se. O mesmo se verificou aquando da sua incubação com arginina em diferentes concentrações, de 1 e 25 mM, para o armazenamento às temperaturas de 4°C e -80°C . Também foi possível concluir que a trealose não indica ser um bom aditivo, tendo demonstrado sempre destabilização de ambas as bandas características do RNA nos espectros de DC.

Por fim, foram também realizados ensaios de transfeção com as células N2a695 para avaliar a atividade biológica do pre-miR-29 sujeito às melhores condições de armazenamento e excipientes encontradas nos ensaios com RNA total. Estes ensaios indicaram que o pre-miR-29 incubado com arginina 1 mM durante, 30 dias à temperatura de -80°C apresenta uma inibição de aproximadamente 100% do mRNA da proteína hBACE 1, comparativamente aos resultados

obtidos para a transfeção do pre-miR-29 sem influência de aditivo ou sob a influência de outras condições de armazenamento. Em suma, os ensaios decorridos no DC apresentam ser uma vantagem promissora permitindo assim o estudo de estabilidade do RNA em diferentes aditivos e condições.

Futuramente, e por forma a dar continuidade a este estudo, é necessário otimizar a etapa de purificação para obter o pre-miR-29 com elevado grau de pureza. Uma abordagem promissora será a utilização de suportes cromatográficos inovadores, como os monolitos, modificados com um derivado de aminoácido, como a Benzil-histidina. Além disto, pretende-se realizar ensaios em triplicado (n=3) dos excipientes já testados nestes ensaios “preliminares”, onde apenas foram realizados ensaios em duplicado (n=2). Adicionalmente, também se pretende realizar ensaios com novas classes de excipientes, aplicando a técnica de DC e as mesmas condições testadas neste trabalho, de maneira a obter uma maior estabilidade da molécula de RNA e uma amostragem mais ampla de excipientes a utilizar como estabilizadores destas moléculas. Ainda neste estudo é desejável aplicar desenho experimental, nomeadamente desenho fatorial para a realização de um “screening” das melhores condições. Futuramente, podem ainda ser realizados estudos *in vitro* para avaliar a eficiência de transfeção de células neuronais com o pre-miR-29b quando armazenado com os novos aditivos, avaliando os níveis de expressão do mRNA da hBACE1, assim como realizar estudos de toxicidade dos excipientes selecionados.

Capítulo 5

Referências bibliográficas

- [1] T. A. Cooper, L. Wan, and G. Dreyfuss, “RNA and Disease,” *Cell*, vol. 136, no. 4, pp. 777-793, 2009.
- [2] I. Vomelová, Z. Vaníčková, and A. Šedo, “Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome,” *Folia Biol. (Praha)*., vol. 55, no. 6, pp. 243-251, 2009.
- [3] J. C. Burnett and J. J. Rossi, “RNA-Based Therapeutics: Current Progress and Future Prospects,” *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 60-71, 2012.
- [4] A. Varshavsky, “Discovering the RNA Double Helix and Hybridization,” *Cell*, vol. 127, no. 7, pp. 1295-1297, 2006.
- [5] S. S. Wijmenga and B. N. M. van Buuren, “The use of NMR methods for conformational studies of nucleic acids,” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 32, no. 4, pp. 287-387, 1998.
- [6] D. Whitford, *Proteins: Structure and Function*. John Wiley and Sons, Ltd, 2005.
- [7] P. A. Sharp, “The Centrality of RNA,” *Cell*, vol. 136, no. 4, pp. 577-580, 2009.
- [8] J. Flinders and T. Dieckmann, “NMR spectroscopy of ribonucleic acids,” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 48, no. 2-3, pp. 137-159, 2006.
- [9] A. Goffeau, B. Hertogh, P. Baret, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, vol. 1, pp. 1-3089, 2004.
- [10] R. Martins, J. A. Queiroz, and F. Sousa, “Ribonucleic acid purification,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1355, pp. 1-14, Aug. 2014.
- [11] G. N. M. Ferreira, “Chromatographic approaches in the purification of plasmid DNA for therapy and vaccination,” *Chem. Eng. Technol.*, vol. 28, no. 11, pp. 1285-1294, 2005.
- [12] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Fourth Edi. New York: Worth Publishers, 2004.
- [13] R. K. Murray and J. C. Davis, *Harper’s Illustrated Biochemistry*, vol. 16, no. 1. 2003.
- [14] N. Lehman, “RNA in evolution,” *Wiley Interdiscip. Rev.*, vol. 1, no. 2, pp. 202-213, 2010.
- [15] D. T. Gjerde, L. Hoang, and D. Hornby, *RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography*. 2009.
- [16] P. Doty, H. Boedtke, J. Fresco, R. Haselkorn, and M. Litt, “Secondary structure in ribonucleic acids,” *Biochemistry*, vol. 45, pp. 482-499, 1959.

- [17] P. Svoboda and A. Di Cara, "Hairpin RNA: A secondary structure of primary importance," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, no. 7-8, pp. 901-918, 2006.
- [18] J. A. Doudna, "Structural genomics of RNA," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 7, pp. 954-956, 2000.
- [19] T. Hermann and D. J. Patel, "RNA bulges as architectural and recognition motifs," *Structure*, vol. 8, no. 3, pp. 47-54, 2000.
- [20] C. Azevedo, *Biologia Celular e Molecular*, 4^a edição. 2005.
- [21] V. P. Zhdanov, "Kinetic models of gene expression including non-coding RNAs," *Phys. Rep.*, vol. 500, no. 1, pp. 1-42, 2011.
- [22] A. Hüttenhofer and J. Vogel, "Experimental approaches to identify non-coding RNAs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 2, pp. 635-646, 2006.
- [23] F. F. Costa, "Non-coding RNAs: Meet thy masters," *BioEssays*, vol. 32, no. 7, pp. 599-608, 2010.
- [24] J. Sana, P. Faltejskova, M. Svoboda, and O. Slaby, "Novel classes of non-coding RNAs and cancer," *J. Transl. Med.*, vol. 10, no. 103, pp. 1-21, 2012.
- [25] P. Pereira, Â. Sousa, J. Queiroz, I. Correia, A. Figueiras, and F. Sousa, "Purification of pre-miR-29 by arginine-affinity chromatography," *J. Chromatogr. B*, vol. 951-952, pp. 16-23, Mar. 2014.
- [26] G. Meister, M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, and T. Tuschl, "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs," *Mol. Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 185-197, Jul. 2004.
- [27] M. Esteller, "Non-coding RNAs in human disease," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 12, no. 12, pp. 861-874, 2011.
- [28] C. H. Li and Y. Chen, "Targeting long non-coding RNAs in cancers: Progress and prospects," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, no. 8, pp. 1895-1910, 2013.
- [29] A. Yamashita, Y. Shichino, and M. Yamamoto, "The long non-coding RNA world in yeasts," *Biochim. Biophys. Acta*, pp. 1-8, Aug. 2015.
- [30] R. Martins, C. J. Maia, J. A. Queiroz, and F. Sousa, "A new strategy for RNA isolation from eukaryotic cells using arginine affinity chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 22, pp. 3217-3226, 2012.
- [31] P. Pereira, Â. Sousa, J. A. Queiroz, A. Figueiras, and F. Sousa, "Pharmaceutical-grade pre-miR-29 purification using an agmatine monolithic support," *J. Chromatogr. A*, vol. 1368, pp. 173-82, Nov. 2014.
- [32] P. Chomczynski and N. Sacchi, "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 2, pp. 581-585, Jan. 2006.
- [33] R. Martins, J. A. Queiroz, and F. Sousa, "Histidine affinity chromatography-based methodology for the simultaneous isolation of Escherichia coli small and ribosomal RNA," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 26, no. 7, pp. 781-788, 2011.

- [34] B. C. Bernardo, F. J. Charchar, R. C. Y. Lin, and J. R. McMullen, "A MicroRNA Guide for Clinicians and Basic Scientists: Background and Experimental Techniques," *Hear. Lung Circ.*, vol. 21, no. 3, pp. 131-142, 2012.
- [35] R. Martins, J. A. Queiroz, and F. Sousa, "New approach in RNA quantification using arginine-affinity chromatography: Potential application in eukaryotic and chemically synthesized RNA," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 27, pp. 8849-8858, 2013.
- [36] P. Pereira, Â. Sousa, J. A. Queiroz, A. Figueiras, and F. Sousa, "New approach for purification of pre-miR-29 using lysine-affinity chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1331, pp. 129-132, Feb. 2014.
- [37] A. Afonso, P. Pereira, J. A. Queiroz, Â. Sousa, and F. Sousa, "Purification of pre-miR-29 by a new O-phospho-l-tyrosine affinity chromatographic strategy optimized using design of experiments," *J. Chromatogr. A*, vol. 1343, pp. 119-127, May 2014.
- [38] A. Ghanem, R. Healey, and F. G. Adly, "Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 760, pp. 1-15, 2013.
- [39] F. Sousa, L. Passarinha, and J. A. Queiroz, "Biomedical application of plasmid DNA in gene therapy: A new challenge for chromatography," *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, vol. 26, no. 1, pp. 83-116, 2009.
- [40] F. Sousa, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, "Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 9, pp. 518-525, Sep. 2008.
- [41] Y. Xiao, A. Rathore, J. P. O'Connell, and E. J. Fernandez, "Generalizing a two-conformation model for describing salt and temperature effects on protein retention and stability in hydrophobic interaction chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1157, no. 1-2, pp. 197-206, 2007.
- [42] J. A. Queiroz, C. T. Tomaz, and J. M. Cabral, "Hydrophobic interaction chromatography of proteins.," *J. Biotechnol.*, vol. 87, pp. 143-159, 2001.
- [43] F. Sousa, C. Cruz, and J. A. Queiroz, "Amino acids-nucleotides biomolecular recognition: From biological occurrence to affinity chromatography," *J. Mol. Recognit.*, vol. 23, no. 6, pp. 505-518, 2010.
- [44] Â. Sousa, C. T. Tomaz, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Successful application of monolithic innovative technology using a carbonyldiimidazole disk to purify supercoiled plasmid DNA suitable for pharmaceutical applications.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 46, pp. 8333-43, Nov. 2011.
- [45] Â. Sousa, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 22, pp. 3046-3058, 2012.
- [46] A. Jungbauer, "Chromatographic media for bioseparation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1065, no. 1, pp. 3-12, 2005.
- [47] A. Jungbauer and R. Hahn, "Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies," *J. Chromatogr. A*, vol. 1184, no. 1-2, pp. 62-79, 2008.
- [48] C. T. Tomaz and J. A. Queiroz, "Hydrophobic Interaction Chromatography," in *Liquid Chromatography*, Elsevier, 2013, pp. 121-141.

- [49] S. Ohtake, Y. Kita, and T. Arakawa, "Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 13, pp. 1053-1073, 2011.
- [50] Z. J. Tan and S. J. Chen, "RNA helix stability in mixed Na⁺/Mg²⁺ solution," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 10, pp. 3615-3632, 2007.
- [51] V. K. Misra and D. E. Draper, "The interpretation of Mg(2+) binding isotherms for nucleic acids using Poisson-Boltzmann theory," *J. Mol. Biol.*, vol. 294, no. 5, pp. 1135-1147, 1999.
- [52] D. J. Klein, P. B. Moore, and T. a Steitz, "The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit," *RNA*, vol. 10, pp. 1366-1379, 2004.
- [53] Z. J. Tan and S. J. Chen, "Nucleic acid helix stability: effects of salt concentration, cation valence and size, and chain length," *Biophys. J.*, vol. 90, no. 4, pp. 1175-1190, 2006.
- [54] K. Chan and P. Rogueda, "Formulating Biomolecules: Mechanistic Insights in Molecular Interactions," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 13, pp. 1051-1052, 2011.
- [55] D. A. Parkins and U. T. Lashmar, "The formulation of biopharmaceutical products," *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 3, no. 4, pp. 129-137, 2000.
- [56] W. Wang, "Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals," *Int. J. Pharm.*, vol. 185, no. 2, pp. 129-188, 1999.
- [57] M. J. Akers, "Excipient-drug interactions in parenteral formulations," *J. Pharm. Sci.*, vol. 91, no. 11, pp. 2283-2300, 2002.
- [58] T. J. Kamerzell, R. Esfandiary, S. B. Joshi, C. R. Middaugh, and D. B. Volkin, "Protein-excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 13, pp. 1118-1159, 2011.
- [59] T. Arakawa, K. Tsumoto, Y. Kita, B. Chang, and D. Ejima, "Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations," *Amino Acids*, vol. 33, no. 4, pp. 587-605, 2007.
- [60] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price, "How to study proteins by circular dichroism," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1751, no. 2, pp. 119-139, Aug. 2005.
- [61] B. M. Bulheller, A. Rodger, and J. D. Hirst, "Circular and linear dichroism of proteins.," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 9, no. 17, pp. 2020-2035, 2007.
- [62] P. Pereira, A. F. Jorge, R. Martins, A. A. C. C. Pais, F. Sousa, and A. Figueiras, "Characterization of polyplexes involving small RNA.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 387, no. 1, pp. 84-94, Dec. 2012.
- [63] C. Delay, W. Mandemakers, and S. S. Hébert, "MicroRNAs in Alzheimer's disease," *Neurobiol. Dis.*, vol. 46, no. 2, pp. 285-290, May 2012.
- [64] S. S. Hébert, K. Horré, L. Nicolăi, A. S. Papadopoulou, W. Mandemakers, A. N. Silahtaroglu, S. Kauppinen, A. Delacourte, and B. De Strooper, "Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 17, pp. 6415-6420, 2008.

- [65] R. Yan and R. Vassar, "Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy.," *Lancet Neurol.*, vol. 13, no. 3, pp. 319-329, Mar. 2014.
- [66] S. Masuda, K. Hori, F. Maruyama, S. Ren, S. Sugimoto, N. Yamamoto, H. Mori, T. Yamada, S. Sato, S. Tabata, H. Ohta, and K. Kurokawa, "Whole-Genome Sequence of the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* Strain W4," *Genome Announc.*, vol. 1, no. 4, pp. 1-2, 2013.
- [67] H. Suzuki, T. Ando, S. Umekage, T. Tanaka, and Y. Kikuchi, "Extracellular production of an RNA aptamer by ribonuclease-free marine bacteria harboring engineered plasmids: a proposal for industrial RNA drug production," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 3, pp. 786-793, Feb. 2010.
- [68] I. Tinoco and C. Bustamante, "How RNA folds," *J. Mol. Biol.*, vol. 293, no. 2, pp. 271-281, 1999.
- [69] H. Suzuki, S. Umekage, T. Tanaka, and Y. Kikuchi, "Extracellular tRNAs of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* are not aminoacylated.," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 73, no. 2, pp. 425-427, 2009.
- [70] H. Suzuki, S. Umekage, T. Tanaka, and Y. Kikuchi, "Artificial RNA aptamer production by the marine bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*: improvement of the aptamer yield using a mutated transcriptional promoter.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 112, no. 5, pp. 458-461, Nov. 2011.
- [71] L. F. A. Amorim, F. Sousa, J. A. Queiroz, C. Cruz, and Â. Sousa, "Screening of l-histidine-based ligands to modify monolithic supports and selectively purify the supercoiled plasmid DNA isoform," *J. Mol. Recognit.*, vol. 28, pp. 349-358, 2015.
- [72] J. F. A. Valente, A. Sousa, J. A. Queiroz, and F. Sousa, "Selective purification of supercoiled p53-encoding pDNA with l-methionine-agarose matrix," *Anal. Biochem.*, vol. 459, pp. 61-69, 2014.
- [73] C. Cruz, A. Sousa, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Study of the specific interaction between l-methionine chromatography support and nucleotides," *J. Chromatogr. B*, vol. 909, pp. 1-5, 2012.
- [74] F. Sousa, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, "Circular dichroism investigation of the effect of plasmid DNA structure on retention in histidine chromatography," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 467, no. 2, pp. 154-162, 2007.
- [75] G. Chen, Z. J. Tan, and S. J. Chen, "Salt-dependent folding energy landscape of RNA three-way junction," *Biophys. J.*, vol. 98, no. 1, pp. 111-120, 2010.
- [76] V. M. Gaspar, E. C. Costa, J. A. Queiroz, C. Pichon, F. Sousa, and I. J. Correia, "Folate-Targeted Multifunctional Amino Acid-Chitosan Nanoparticles for Improved Cancer Therapy," *Pharm. Res.*, vol. 32, no. 2, pp. 562-577, 2014.